Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. med. Georg Schmidt

Methämoglobinbildung in vitro durch verschiedene Arzneimittelmetaboliten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerda Frey
aus Tübingen

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0025

Aus dem Institut für Gerichtliche Medizin der Universität Tübingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. med. Georg Schmidt

Methämoglobinbildung in vitro durch verschiedene Arzneimittelmetaboliten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerda Frey
aus Tübingen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. W. Graumann

Berichterstatter: Professor Dr. Gg. Schmidt

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	HÄMOGLOBIN	3
2. 1.	Hämoglobinstruktur	3
2. 1.1.	Häm	3
2. 1.2.	Globin	4
2. 1.3.	Bindung von Häm an Globin	4
2. 1.4.	Kristallstruktur	5
2. 2.	Physikalisch-chemische Eigenschaften	5
2. 2.1.	Magnetische Suszeptibilität	5
2. 2.2.	Löslichkeit	5
2. 2.3.	Elektrophorese	6
2. 2.4.	Denaturierung	6
2. 2.4.1.	Säuredenaturierung	6
2. 2.4.2.	Alkalidenaturierung	6
2. 2.4.3.	Hitzedenaturierung	6
2. 2.4.4.	Oxydative Denaturierung und Präzipitation	6
2. 2.5.	Spektrales Verhalten	7
2. 3.	Physiologische Eigenschaften des Hb	8
2. 3.1.	Oxygenierung	8
2. 3.2.	Bohr-Effekt	9
2. 3.3.	Pufferwirkung	9
2. 4.	Hb-Varianten und -Anomalien	9
2. 4.1.	Physiologische Varianten	9

Seite

2. 4.1.1. Hb A_1 9
2. 4.1.2. Hb A_2 9
2. 4.1.3. Hb F 9
2. 4.2. Hb-Anomalien 10
2. 4.2.1. Tetramere 10
2. 4.2.2. Hb M 10
2. 4.2.3. Sichelzellen-Hb 10
2. 4.2.4. $Hb_{Zürich}$ 11

2. 5. Hämoglobin-Derivate 11

2. 5.1. Physiologische Zustandsformen 11
2. 5.2. Pathologische Derivate des Hb 11
2. 5.2.1. Kohlenoxyd-Hb 11
2. 5.2.2. Stickoxyd-Hb 12
2. 5.2.3. Nitrosobenzol-Hb 12
2. 5.2.4. Cyanhämoglobin 12
2. 5.2.5. Hämochrome 12

3. REDUKTIONSMECHANISMEN 13

3. 1. Schützende Mechanismen in vivo 13

3. 1.1. Elektronenlücke 13
3. 1.2. Katalase 13
3. 1.3. Peroxydatische Wirkung von Hb 14
3. 1.4. Glutathionperoxydase 14
3. 1.5. Glutathion, Cystein, Ergothionin 14

3. 2. Reduktion des Methämoglobins 14

3. 2.1. Überblick 14
3. 2.2. Diaphorasesystem 15
3. 2.3. Hämiglobinreduktasesystem 15
3. 2.4. Glutathion 16
3. 2.5. Ascorbinsäure 17
3. 2.6. Reversibel oxydierbare Farbstoffe 17
3. 2.7. Rückbildungsgeschwindigkeit 17

Seite

4. METHÄMOBLOBINBILDUNG 19

4. 1. Allgemeines zur Methämoglobinbildung 19

4. 1.1. Weitere Blutwirkungen von Hb(III)-Bildnern 19
4. 1.2. Wirkungsstärke und Wirkungsgröße der Hb(III)-Bildner ... 20
4. 1.3. Erythrozytenalter und Hb(III)-Bildung 20
4. 1.4. Hb(III)-Bildung und Lebensalter 20
4. 1.5. Bedeutung der Tier- und in vitro-Versuche 21
4. 1.6. Alkohol und Methämoglobinämie 21

4. 2. Methämoglobin 21

4. 2.1. Eigenschaften 21
4. 2.2. Der Hb(III)-Gehalt des normalen Blutes 22

4. 3. Hämiglobin-Derivate 23

4. 3.1. Cyan-Methämoglobin 23
4. 3.2. Nitrit-Methämoglobin 23
4. 3.3. Methämoglobin-Sulfid 23
4. 3.4. Fluor-Methämoglobin 24

4. 4. Verdoglobine 24

4. 5. Heinzkörper 24

4. 6. Klinische Symptome der Methämoglobinämie 25

4. 7. Autoxydation 25

4. 8. Wasserstoffperoxyd 26

4. 9. Anorganische Oxydationsmittel 26

4. 9.1. Kaliumferricyanid 26
4. 9.2. Ozon, Halogene, Permanganat, Chromat 26
4. 9.3. Chlorat 27

Seite

4.10. Anorganische Stickstoffverbindungen 27

4.10.1. Nitrit 27
4.10.2. Ester der salpetrigen Säure 28
4.10.3. Hydroxylamin 28

4.11. Chinon und chinoide Substanzen 28

4.11.1. Wirkungsmechanismen 28
4.11.2. Polyphenole 29
4.11.3. p-Aminophenol 29
4.11.4. Phenylendiamin 29
4.11.5. Chinoline 29

4.12. Aromatische Amine 30

4.12.1. Metabolismus der aromatischen Amine 30
4.12.2. Mechanismus der Hb(III)-Bildung 31
4.12.3. Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol 31
4.12.4. Anilin und Substitutionsprodukte 32
4.12.5. Acetanilid 33
4.12.6. Phenacetin 33
4.12.7. Sulfonamide 33
4.12.8. Karzinogene Wirksamkeit 34

4.13. Aromatische Nitroverbindungen 34

4.13.1. Reduktion zu wirksamen Hb(III)-Bildnern 34
4.13.2. Nitrobenzol und Substitutionsprodukte 35
4.13.3. Polynitrobenzole 35
4.13.4. Nitrofuranderivate 36
4.13.5. Parathion 36

5. NACHWEIS DES METHÄMOGLOBINS 37

5. 1. Hautkolorit und Hb(III)-Konzentration 37

5. 1.1. Derivate des Blutfarbstoffs 37
5. 1.2. Verdoglobine 37

Seite

5. 1.3. Sauerstoffdissoziation 37
5. 1.4. Farbstoffe 38

5. 2. Reduktion und Spontanoxydation als Fehlermöglichkeiten der Hb(III)-Bestimmung 38

5. 2.1. Reduktion 38
5. 2.2. Spontanoxydation 39

5. 3. Verschiedene Nachweismethoden 39

5. 3.1. Grüne Kohlenmonoxydmethode 39
5. 3.2. Cyanidmethode 40
5. 3.3. Hb(III)-Bestimmung nach Horecker u. Brackett 40
5. 3.4. Hb(III)-Bestimmung nach Austin u. Drabkin 40
5. 3.5. Quotientenmethode nach Hüfner-Heilmeyer u. Muller-Zijlstra 40
5. 3.6. Fluoridmethode 41
5. 3.7. Fehlermöglichkeiten der Hb(III)-Bestimmung 41

6. AUSFÜHRUNG DER NACHWEISMETHODEN 42

6. 1. Materialien 42

6. 2. Aufzeichnung der Spektralbilder 42

6. 3. Versuche mit kristallisiertem Hb u. K-Nitrit 45

6. 4. Kohlenmonoxydmethode 46

6. 4.1. Ausführung 46
6. 4.2. Herstellung einer Verdünnungsreihe 46
6. 4.3. Versuche zur Ausschaltung der Hb(III)-Leerwerte 48

6. 5. Cyanidmethode 49

6. 6. Anfertigung einer Eichkurve 50

Seite

7. UNTERSUCHUNGEN ÜBER METHÄMOGLOBINBILDUNG DURCH VERSCHIEDENE ARZNEIMITTELMETABOLITEN 54

7. 1. Verwendete Metaboliten 54

7. 2. Hämolysatansätze 58

7. 3. Vollblutansätze 58

7. 4. Erythrozytensuspensionen 59

7. 5. Ergebnisse 61

8. DISKUSSION 62

9. ZUSAMMENFASSUNG 66

ERLÄUTERUNG DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN 67

LITERATURVERZEICHNIS 68

1. EINLEITUNG

Seit der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts ist der oxydierte rote Blutfarbstoff - der Name Methämoglobin wurde zum ersten Mal 1864 von HOPPE SEYLER genannt -, dem die Fähigkeit zur reversiblen Sauerstoffaddition verloren ging, häufig diskutierter Gegenstand in Pharmakologie und Toxikologie. Methämoglobinämie im Organismus kann durch eine Vielzahl verschiedener Substanzen hervorgerufen werden, die von LEWIN 1889 als Blutgifte bezeichnet wurden. Wir können zwischen direkten (Kaliumferricyanid, Nitrit, Chlorat, Hydroxylmin) und indirekten Methämoglobinbildnern unterscheiden. Die erst erwähnten Stoffe bewirken die Oxydation des Hämoglobins auch außerhalb des Körpers in vitro, während die letzteren zuvor im Organismus in wirksame Agentien umgewandelt werden müssen.

Den größten und klinisch wichtigsten Anteil der indirekten Blutgifte stellen die aromatischen Stickstoffverbindungen als Basis vieler Arzneimittel dar. Für den Körper sind Arzneimittel Fremdstoffe, die er zu eliminieren sucht (Chemical Defence Hypothesis von SHERWIN 1922 zit. von WILLIAMS 1959). Die Metabolisierungsreaktionen sind für die Konfiguration der applizierten Substanzen jeweils spezifisch (WILLIAMS 1959) und finden hauptsächlich in der Leber, weniger in Lunge, Niere oder anderen Organen statt. Die Lebermikrosomen metabolisieren in Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff (in Frage kommende Reaktionen sind Oxydationen, Reduktionen, Hydrolysen, Synthesen) die Fremdstoffe, greifen aber nicht die körpereigenen Substanzen an (WILLIAMS 1959 zit. BRODIE 1956). Auf Grund dieser spezifischen Eigenschaften der Lebermikrosomen kann durch Applikation von Hemmstoffen der mikrosomalen Enzyme, wie z.B. SKF 525 A (Diäthylaminoäthyl-diphenylpropylacetat), die Aktion vieler Pharmaka verlängert werden, ohne daß Enzyme, die natürliche Verbindungen katalysieren, geschädigt werden (WILLIAMS 1959). Interessant ist die zunehmende Aktivität der mikrosomalen Enzyme bei aufsteigender phylogenetischer Entwicklung und die unterschiedliche Metabolisierungsrate bei verschiedenen Species und Individuen.

Das biochemische Umwandlungsprodukt eines Pharmakons kann so in Wir-

kungsstärke und Wirkungsrichtung von seiner Muttersubstanz differieren. Oft sind erst die Metaboliten die pharmakologisch wirksamen oder stärker wirksamen Agentien, ebenso gut können aber auch aus indifferenten Substanzen giftige Stoffe entstehen. Die endgültige Inaktivierung erfolgt meist durch Konjugation mit Glucuronsäure, Schwefelsäure und Glycin. Bereits entgiftete Stoffe können durch hydrolytische Spaltung des Konjugats erneut toxisch werden (WILLIAMS 1959, FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1966).

Die Nebenwirkungen von Arzneimitteln beruhen somit zu einem großen Teil auf der Bildung toxischer Stoffwechselprodukte, die vor ihrer Elimination aus dem Kreislauf ihre giftige Wirkung auf die Blutzellen ausüben können (ARGENTON 1966). In der forensischen Toxikologie beruht der Giftnachweis derartiger Hb(III)-bildenden Substanzen sowohl auf der Identifizierung dieser Stoffe selbst als auch auf dem Nachweis ihrer Wirkung auf den Blutfarbstoff, die für zahlreiche Arzneimittel, Gifte und Umwandlungsprodukte bekannt ist. Mit fortschreitender Entwicklung der Pharmakologie wird in neuerer Zeit eine immer größere Zahl von Substanzen und vor allem ihrer Stoffwechselprodukte bekannt, die im Körper toxisch werden können, von denen aber weder die allgemeine pharmakologisch-toxische Wirkung noch der Einfluß auf den Blutfarbstoff geprüft worden sind. So ist es in fraglichen Vergiftungsfällen mit Hb(III)-Bildung sowohl diagnostisch als auch prognostisch von großer Bedeutung, die Ursache der Blutfarbstoffveränderungen zu erfassen. Um die Kenntnisse über mögliche Hb(III)-Bildner unter den Arzneimittelmetaboliten zu erweitern, untersuchten wir die uns zugänglichen Metaboliten zunächst einmal in vitro an Suspensionen menschlicher Erythrozyten auf ihre Fähigkeit zur Oxydation des roten Blutfarbstoffs. Zum Vergleich ihrer Wirksamkeit verwendeten wir p-Aminophenol als Stoffwechselprodukt mehrerer gebräuchlicher Arzneimittel (Antifebrin, Phenacetin), dessen Eigenschaft, Hb(III) zu bilden, seit längerem bekannt ist. Die Methämoglobinbestimmung wurde mit zwei verschiedenen Nachweismethoden durchgeführt und deren Fehlermöglichkeiten diskutiert. Zuvor soll jedoch auf die wichtigsten Eigenschaften des Hämoglobinmoleküls sowie auf die Mechanismen der Hb(III)-Bildung durch die zahlreichen Hämoglobingifte eingegangen werden.

2. HÄMOGLOBIN

2.1. HB-STRUKTUR

Die Hämoglobin-Biosynthese findet in den unreifen roten Zellen des Knochenmarks statt, die durch einen großen auf Grund seines DNS-Gehaltes basophilen Kern ausgezeichnet sind. Die DNS bestimmt in der genetischen Information die Nucleotidsequenz der plasmatischen RNS und damit die Aminosäuresequenz der Proteine. Die weitere Reifung der roten Zellen bringt das Verschwinden des Kerns, Abnahme der RNS und durch das entstandene Hämoglobin die acidophile Färbung des Plasmas mit sich (ALLEN 1964). Der reife Erythrozyt enthält 35% Hb, das sind 16 g% des Gesamtblutes. Am Trockengewicht des Erythrozyten macht der Anteil des Hb 95% aus.

Hämoglobin ist chemisch gesehen ein Chromoproteid, dessen prosthetischen Anteil die Farbstoffkomponente Häm und dessen Proteinanteil das Globin darstellt. Die endgültige Aufklärung der Struktur erfolgte durch PERUTZ 1962. Das Molekulargewicht, ermittelt durch osmotischen Druk und Ultrazentrifuge, beträgt 68 000 (Pferde-Hb), entsprechend vier Atomen 2-wertigen Eisens. Auf ein Atom Eisen bezogen, erhält man ein minimales Molekulargewicht von 17 000. Für das menschliche Hämoglobin schloß man jedoch durch den Eisengehalt von 0,338% auf ein Molekulargewicht von 66 000 (LEUTHARDT 1963).

2.1.1. Häm

Häm ist das komplexe Eisensalz des Protoporphyrins IX, entstanden aus Ätioporphyrin III. Es enthält 2-wertiges Eisen mit der Koordinationszahl 6, welches durch zwei Haupt- und zwei Nebenvalenzen an den Stickstoff der Pyrrolringe des Porphyrins gebunden ist (LEUTHARDT 1963).

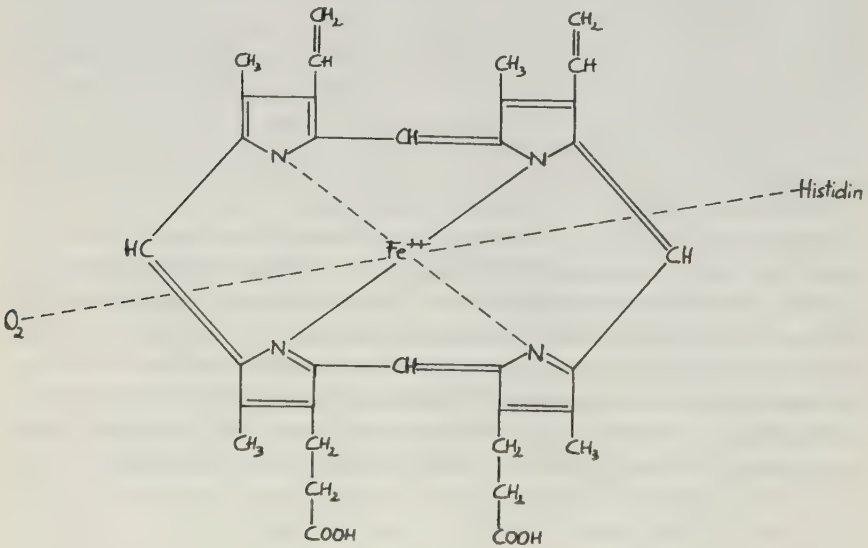
2.1.2. Globin

Globin, ein Hämalbumin, ist durch seinen Reichtum an der Aminosäure Histidin ausgezeichnet. Es ist aus vier Polypeptidketten zusammengesetzt, von denen jeweils zwei identisch sind:

2 α-Ketten à 141 Aminosäuren
2 β-Ketten à 146 Aminosäuren (LEUTHARDT 1963).

2.1.3. Bindung von Häm an das Globin

Dem Hb kommt also folgende Strukturformel zu:



Häm und Globin sind durch eine Nevenvalenz des Eisens zum Stickstoff des Imidazolrings von Histidin verbunden. Die noch freie 6. Nebenvalenz befähigt das Eisen im intakten Hämoglobin, Sauerstoff zu binden. Dicht neben dem ligierten Histidin tragen die β-Ketten Cystein, das die reaktiven Sulfhydryl-Gruppen des Hb stellt (ALLEN 1964 zit. PERUTZ 1962). Das ist zugleich die Stelle, an der sich die beiden β-Ketten berühren. Oxydation

oder Bindung der beiden Sulfhydryl-Gruppen hemmt somit die "Heme-Heme-Interactions" (s. Kap. 2.3.1.) bei der Oxygenierung (ALLEN 1964 zit. RIGGS 1962).

2.1.4. Kristallstruktur

Bei der Dialyse von gereinigten Hämolysaten gegen Ammoniumsulfat isolierten PERUTZ u. O. WEISZ 1947 tetragonale Kristalle von HbCO und stellten dessen Isomorphie mit HB(III) fest, während reduziertes HB eine andere Kristallstruktur aufwies.

2.2 PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Hämoglobins dienen vor allem zur Charakterisierung und Differenzierung der verschiedenen Hb-Varianten und Hb-Derivate.

2.2.1. Magnetische Suszeptibilität

Hb(III) und reduziertes Hb verhalten sich paramagnetisch, das entspricht einem heteropolaren (Jonen-)Bindungsvermögen. HbO_2 und HbCO verhalten sich diamagnetisch, d.h. O_2 und CO sind kovalent mit einem Elektronenpaar ihrer Elektronenschalen an das Eisen gebunden (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1951).

2.2.2 Löslichkeit

Neugeborenen-Hb ist besser löslich als das Hb von Erwachsenen, z.B. bei pH 6,5 und 24° C etwa fünfmal leichter. Reduziertes HB ist fünfmal schlechter löslich als HbO_2 und etwa zweimal weniger als HbCO. Von klinischer Bedeutung ist diese Eigenschaft beim Sichelzellen-Hb, das sich im oxygenierten Zustand nicht anders verhält als HbO_2, während reduziertes Hb_S leicht ausfällt (BETKE 1954).

2.2.3. Elektrophorese

Die meisten elektrophoretischen Untersuchungen werden im alkalischen Milieu (pH 8,6) durchgeführt, bei dem alle Hämoglobine in unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Anode wandern. Reduziertes Hb wandert rascher als HbO_2. Für die verschiedenen Hb-Varianten (s. Kap. 2.4.2.) ergibt sich folgende Differenzierung (MARTI 1963), wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von links nach rechts zunimmt:
$C < E = A_2 < S = D < G =$ Zürich $< F < A_1 = M < K < J <$ Bartsch $< H = J$.
MARTI 1963 weist darauf hin, daß bei jeder Elektrophorese der Hauptfraktion eine schneller wandernde Komponente vorauseilt, die mit dem Alter des Hämolysats oder der Erythrozyten zunimmt. Er nennt diese Nebenfraktion HbA_3 bzw. HbF_2 und deutet sie als Alterungsprodukt. ALLEN u. JANDL 1961 erhielten diese "fast moving components" durch oxydative Denaturierung von Hb mit Kaliumferricyanid oder Phenylhydrazin und Sauerstoff, wobei die zwei reaktiven Sulfhydryl-Gruppen des Globins oxydiert werden. Die gesteigerte elektrophoretische Beweglichkeit beruht wohl auf der Vermehrung von negativ beladenen Gruppen (ALLEN 1964). Die Hämgruppe ist bei den "fast-moving components" unverändert, nur das Globin ist denaturiert.

2.2.4. Denaturierung

2.2.4.1. Säuredenaturierung hat auch jetzt noch praktische Bedeutung durch die Bestimmung der Hb-Konzentration mit Salzsäure nach der Sahli-Methode.

2.2.4.2. Die Alkalidenaturierung ist das wichtigste diagnostische Mittel zur Differenzierung von fetalem und adultem Hämoglobin, da HbF größere Resistenz gegen Alkali zeigt. Trotz der unterschiedlichen Denaturierungsgeschwindigkeit der beiden Hb-Varianten ist für die endgültige Denaturierung dieselbe Menge Alkali erforderlich (BETKE 1954).

2.2.4.3. Bei Hitzedenaturierung erweist sich HbCO und vor allem Hb(III)CN stabiler als HbO_2 (BETKE 1954).

2.2.4.4. Oxydative Denaturierung und Präzipitation

Die oxydative Denaturierung geht langsam spontan in Gegenwart von Sauerstoff oder schnell, bedingt durch oxydierende Stoffe, vor sich. ALLEN u.

JANDL zeigten 1961 in Versuchen mit Kaliumferricyanid und Phenyl- bzw. Acetylphenylhydrazin die einzelnen Schritte dieses Vorgangs auf:

Erster Schritt: Oxydation von Glutathion (GSH→ GSSG)
Ein Teil des GSH bildet durch Bindung an die Sulfhydryl-Gruppen des Globins mit dem Hb gemischte Disulfide, wodurch Hb vor Oxydation geschützt werden soll. Elektrophoretisch wandern sie mit den "fast-moving components" (s. u. dritter Schritt).

Zweiter Schritt: Oxydation von Hämoglobin zu Methämoglobin ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$)

Dritter Schritt: Oxydation der zwei exponierten reaktiven Sulfhydryl-Gruppen des nativen Hämoglobins ergibt reversibel denaturiertes, noch lösliches Hb, das sich in der Elektrophorese als "fast moving components" darstellen läßt.

Dem dritten Schritt folgt der Verlust der normalen Konfiguration des Hb-Moleküls, die restlichen vier reaktiven Sulfhydryl-Gruppen des Hb werden für die Oxydation empfindlicher. Im Laufe ihrer Oxydation und der noch weiterer Gruppen im Globin bilden sich Sulfhämoglobin (Verdoglobin) und andere grüne bis braune Hb-Derivate, schließlich polymerisieren die denaturierten Hb-Moleküle (vielleicht durch Wasserstoffbindung) und präzipitieren (Heinz-Körper). Für die Hämolyse ist wohl die Schädigung der Enzyme der Erythrozytenmembran maßgeblich.

2.2.5. Spektrales Verhalten

Im sichtbaren Spektralbereich zeigt das Hämoglobin in seinen verschiedenen Zustandsformen charakteristische Absorptionsbanden. Die Absorptionsmaxima einiger Hb-Derivate sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

	Absorptionsmaxima in nm	
reduziertes Hb	555	
HbO_2	540	578
HbCO	538	572
HbNO	540	572,5
HbNB	542	567
Hb(III) bei pH 6,8		630
$Hb(III)NO_2$	625	638
Hb(III)CN	540	
Hb(III)F		606
Hämochrome	529	558
Verdoglobine	610-640	

Bei H_2O-Entzug zeigen reduziertes Hb und Hb(III) Änderung im spektralen Verhalten, HbO_2, Hb(III)CN und Hb(III)F jedoch nicht (BETKE 1954).

Die Sorètbande im langwelligen Ultraviolett (410 - 440 nm) ist hämbedingt und somit allen Hämoproteiden gemeinsam. In der Reihenfolge Hb(III), HbO_2, Hb(III)CN, HbCO, reduziertes Hb verschiebt sie sich zunehmend nach der langwelligen Seite (MARTI 1963).

Die proteinbedingte Absorption liegt zwischen 250 - 350 nm. Die größte Bedeutung für diagnostische Zwecke hat die Tryptophanbande bei 291 nm.

2.3. PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DES HÄMOGLOBINS

2.3.1. Oxygenierung

In der Sauerstoffversorgung der Gewebe liegt die große, lebensnotwendige Aufgabe des Hämoglobins. Die Sauerstoffkapazität beruht auf der Menge des vorhandenen Eisens, denn ein Atom Fe ist befähigt, ein Molekül Sauerstoff reversibel zu binden. Dieser Vorgang ist an die Intaktheit des Globins gebunden (KIESE 1954). Der Sättigungsgrad ist abhängig vom Sauerstoffpartialdruck und der bei den verschiedenen Species differierenden Sauerstoffaffinität (BETKE 1954) und läßt sich graphisch in der S-förmigen O_2-Dissoziationskurve darstellen. Bei Methämoglobinämie ist sie nach links verschoben (JAFFE 1964 zit. GIBSON 1954). Die Sauerstoffaddition gründet sich auf einer schrittweisen Oxygenierung der einzelnen Hämgruppen im Molekül, wobei die O_2-Affinität mit zunehmender O_2-Beladung steigt. Dies wird durch die Wechselwirkung der Hämgruppen aufeinander ("Heme-Heme-Interactions") erklärt (MARTI 1963). HAUROWITZ 1951 sieht im Hydrat die normale Zustandsform des reduzierten Hb und postuliert für das Gleichgewicht $Hb_{H_2O} \rightleftharpoons HbO_2$ Anhydro-Hb als Intermediärprodukt.

Die Diskrepanz zwischen dem Eisengehalt und dem Sauerstoffbindungsvermögen von 2,5% (REMMER 1956), die nicht durch Hb(III)-Anwesenheit erklärt werden kann, könnte durch VAN SLYKE'S inaktives Hb (1946), das sich zwar wie Hb(III) reduzieren läßt, aber keine Verbindung mit CN eingeht und dessen Gehalt bei längerem Stehenlassen einer Blutprobe abnimmt, oder durch KIESE'S Verdoglobin bedingt sein (s. Kap. 4.4.).

2.3.2. Bohr-Effekt

Dadurch, daß HbO_2 eine stärkere Säure ist als reduziertes Hb, wird die Bildung von Kohlensäure aus Bikarbonat gefördert. Umgekehrt vermindert steigende CO_2-Spannung die Sauerstoffsättigung des Hb (Bohr'scher Effekt). Somit wird die CO_2-Abgabe in der Lunge und die O_2-Abgabe ins Gewebe erleichtert (LEUTHARDT 1963).

2.3.3. Pufferwirkung

Vor allem durch die Imidazolgruppe des Histidin hat Hämoglobin im physiologischen pH Bereich eine starke Pufferwirkung (LEUTHARDT 1963).

2.4. HÄMOGLOBIN-VARIANTEN UND -ANOMALIEN

Die verschiedenen Hämoglobine unterscheiden sich im Aufbau des Globins, beruhen also auf einem primären Molekülunterschied. Dies bedingt jeweils eine Änderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften (MARTI 1963).

2.4.1. Physiologische Varianten

2.4.1.1. Das normale Hämoglobin des Erwachsenen ist das HbA_1.

Bei der Geburt beträgt es 20-40% des Gesamthämoglobins. Die vier Polypeptidketten seines Globins sind mit $\alpha_2\beta_2$ charakterisiert.

2.4.1.2. HbA_2, eine physiologische Variante des Erwachsenenhämoglobins, tritt erst ab dem 1. bis 2. Lebensjahr auf und hat eine etwas geringere O_2-Affinität als HbA_1. Bei Thalassämia minor ist HbA_2 vermehrt. Charakteristikum der Polypeptidketten: $\alpha_2\delta_2$.

2.4.1.3. Bei der Geburt bestehen 60-80% des roten Blutfarbstoffs aus HbF (fetales Hb), welches innerhalb von fünf Monaten schon auf 3-15% reduziert ist. Im Nabelschnurblut ist die O_2-Affinität erhöht, im Hämolysat dagegen

vermindert (BETKE 1954). Die Polypeptidketten werden mit $\alpha_2\gamma_2$ bezeichnet. Die γ-Kette enthält die Aminosäure Isoleucin, welche in HbA_1 nicht vertreten ist (MARTI 1963).

2.4.2. Hämoglobin-Anomalien

In letzter Zeit wurde eine immer größere Anzahl dieser abartigen Hämoglobine festgestellt. Es handelt sich um hereditäre Anomalien der Globinsynthese, also Hämoglobinopathien. Bei homozygot betroffenen Individuen besteht meistens zugleich eine hämolytische hyporegeneratorische Anämie, während heterozygote Merkmalsträger häufig keine klinischen Symptome aufweisen. Die anomalen Hämoglobine, zumeist β-Ketten-Anomalien, werden mit großen Buchstaben des Alphabets bezeichnet.

2.4.2.1. Tetramere sind Hämoglobine, die vier gleichartige Polypeptidketten enthalten, z.B.

HbH: β_4, neigt zu Spontanoxydation,

Hb_{Barts}: γ_4

$Hb_{Augusta}$: β_4^S, ist ein anomales Tetramer (MARTI 1963).

2.4.2.2. HbM. HÖRLEIN u. WEBER beschrieben 1948 eine Familie mit erblicher Cyanose dominanten Erbgangs. Sie stellten eine Hb(III)-Konzentration von 11 - 24% fest. Das Methämoglobin zeigte aber ein vom normalen Hb(III) abweichendes spektrales Verhalten mit einem Maximum bei 600 nm. Inzwischen hat sich herausgestellt, daß es verschiedene Varianten des HbM gibt, die, wie z.B. das $HbM_{Milwaukee}$, dem normalen Hb(III) in ihrem Verhalten sehr ähnlich sind. Die Lokalisation der Anomalien betrifft α- oder β-Ketten (Histidin ist durch Tyrosin ersetzt). Die Abweichung im Aufbau des Globins stört die Bindung des Häm an das Globin und damit die "Heme-Heme-Interactions". Daraus erfolgt die erhöhte Neigung des HbM zu Spontanoxydation und somit die chronische Cyanose. Es wurden bisher nur heterozygote Individuen beobachtet. Die Hb(III)-Rückbildungsmechanismen sind intakt, können jedoch die große anfallende Methämoglobinmenge nicht bewältigen (MARTI 1963).

2.4.2.3. Sichelzellenhämoglobin (HbS), die bekannteste genetisch determinierte Hämoglobinanomalie ist besonders häufig bei den Negervölkern Ameri-

kas und Afrikas. Durch Austausch von Glutamin durch Valin in der α-Kette wird der Ladungszustand des Moleküls und damit die Löslichkeit verändert, so daß das reduzierte HbS ausfällt (reversible Sichelzellenbildung, Ausprägung je nach HbS-Gehalt der Zelle, LEUTHARDT 1963). Homoygote Individuen erreichen fast nie das geschlechtsreife Alter; ihr Blut enthält 80-100% HbS. Heterozygote Erbmalsträger (HbS-Gehalt 30-45%) weisen kaum klinische Symptome auf, sind aber widerstandsfähiger gegen Plasmodium folciparum als normale Individuen. Interessant ist, daß Anwesenheit von 20% Hb(III) eine Verlängerung der Erythrozytenlebensdauer durch Verschiebung der O_2-Dissoziationskurve bedingt.

2.4.2.4. $Hb_{Zürich}$, in dessen β-Kette nahe der Hämansatzstelle (ARGENTON 1966) ein Histidin durch Arginin ersetzt ist, neigt zu Spontanoxydation. Durch exogene Faktoren (z.B. Einnahme von Sulfonamiden) manifestiert sich eine paroxysmale hämolytische Anämie mit Innenkörperbildung aus präzipitiertem $Hb_{Zürich}$ (MARTI 1963).

2.5. HÄMOGLOBIN-DERIVATE

Die Hb-Derivate sind erworbene, sekundäre Veränderungen des Hämoglobinmoleküls, die normale und anomale Hämoglobine betreffen.

2.5.1. Physiologische Zustandsformen

Oxyhämoglobin und reduziertes Hämoglobin sind die physiologischen Zustandsformen des roten Blutfarbstoffs. Bei der Oxygenierung wird das Wasser an der Fe-Koordinationsstelle durch Sauerstoff verdrängt, dabei schlägt die Farbe des Hämoglobins von dunkelrot nach hellrot um. Eisen ist in HbO_2 fester gebunden als in reduziertem Hb (LEUTHARDT 1963).

2.5.2. Pathologische Derivate des Hämoglobins

2.5.2.1. Kohlenoxydhämoglobin ist von kirschroter Farbe und im Gegensatz zu Oxyhämoglobin sehr stabil. Die Affinität des Kohlenmonoxyds zu Hb ist

300mal stärker als diejenige des Sauerstoffs. Sie wird durch die 10 - 12mal langsamere Assoziations- und die 1000mal langsamere Dissoziationsgeschwindigkeit bestimmt (BETKE 1954). Die Dissoziation nimmt bei steigender Wasserstoffionenkonzentration und Verdünnung zu (KURZ u. WALLER 1954). Gegen Alkali ist HbCO resistenter als HbO_2, dabei bildet sich im Gegensatz zu allen anderen Hb-Derivaten, die bei diesem Vorgang einen braunen Farbton annehmen, ein rotes Denaturierungsprodukt (MARTI 1963).

2.5.2.2. Stickoxydhämoglobin entsteht neben Hb(III) bei Einwirkung von Nitrit auf Hämoglobin unter Ausschluß von Sauerstoff und ist eine ziemlich stabile Verbindung. Bei Zugabe von Kaliumferricyanid entsteht langsam Hb(III) (JUNG u. REMMER 1949). Das spektrale Verhalten ist ähnlich demjenigen von HbCO; oft entsteht es postmortal (SCHWERD 1962, HEUBNER 1952-54).

2.5.2.3. Nitrosobenzolhämoglobin

JUNG beschrieb 1940, daß Nitrosobenzol mit Hämoglobin diesen violetten Farbstoff bildet, der in vitro mit Ascorbinsäure und mit Kaliumferricyanid in Hb(III) überführbar ist. Unter Sauerstoff geht HbNB langsam in Verdohämochromogen über. Das spektrale Verhalten ist demjenigen des HbNO sehr ähnlich, jedoch ist die Einsenkung zwischen den Maxima sehr gering.

2.5.2.4. Cyanhämoglobin ist sehr instabil und tritt bei Reduktion von Cyanmethämoglobin auf (SCHWERD 1961).

2.5.2.5. Hämochrome sind Verbindungen des Häm mit basischen Gruppen (denaturierte Proteine, Pyridin, Nikotin, Hydrazin usw.), wobei das Eisen jeweils mit zwei Nebenvalenzen an die Basen gebunden ist. Somit geht die Fähigkeit, Sauerstoff zu binden, verloren. Die Spektren ähneln dem HbO_2 (LEUTHARDT 1963, KIESE 1954).

Auf die Eigenschaften von Methämoglobin, seinen Derivaten und Verdoglobinen soll in einem späteren Kapitel (4.2. - 4.4.) eingegangen werden.

3. REDUKTIONSMECHANISMEN

3.1. SCHÜTZENDE MECHANISMEN IN VIVO

Den oxydierenden Agentien werden im intakten Erythrozyten einige Mechanismen entgegengestellt, die zur Stabilität des Hämoglobins und des nativen Proteins beitragen.

3.1.1. Elektronenlücke

Durch das Fehlen von Mitochondrien befindet sich im Erythrozyten kein intaktes Cytochromsystem (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1957), so entsteht eine schützende Elektronenlücke zwischen dem molekularen Sauerstoff und den intrazellulären Elektronendonatoren (Fe^{++} und Sulfhydryl-Gruppen) (JAFFE 1964).

3.1.2. Katalase

Die roten Zellen sind reich an Katalase, einem Hämprotein, dessen schützende Wirkung in der Spaltung von intermediär entstandenem Wasserstoffperoxyd besteht. Die Aktivität dieses Enzyms kann durch hohe Konzentration an H_2O_2 gesteigert werden, während bei geringer H_2O_2-Bindung die Katalase keinen Oxydationsschutz mehr darstellt. Patienten mit Katalasemangel als angeborenem Defekt erscheinen auch bei starker Beeinträchtigung der Enzymaktivität (bis 0,5% der Norm) klinisch gesund (MARTI 1963). Auffallender Anstieg des Hb(III)-Gehaltes zeigt sich vor allem nach Röntgenbestrahlung, da durch diese Strahlen im Übermaß Wasserstoffperoxyd gebildet wird (JAFFE 1964 zit. AEBI et al. 1962).

3.1.3. Peroxydatische Wirkung von Hb

Hämoglobin selbst besitzt auch peroxydatische Wirkung, jedoch kommt es nach MARTI nicht zurSpaltung, sondern nur zur Elektronenübertragung auf H_2O_2. BETKE (1954) sieht in Hämiglobin die peroxydatisch wirkende Zustandsform des Hb, die durchaus mit der echten pflanzlichen Peroxydase vergleichbar ist. Die funktionelle Bedeutung bleibt jedoch fraglich.

3.1.4. Die Glutathionperoxydase schützt Hämoglobin vor der gekuppelten Oxydation durch Ascorbinsäure, Cystein, Acetylphenylhydrazin durch Spaltung des intermediär gebildeten Wasserstoffperoxyds, wobei gleichzeitig Glutathion in Glutathiondisulfid übergeführt wird.

3.1.5. Glutathion, Cystein, Ergothionin sin in erster Linie wichtig für die Stabilität der Sulfhydryl-Gruppen des Hämoglobins und anderer Proteine der roten Zelle und der Zellmembran (JAFFE 1964).

3.2. REDUKTION DES METHÄMOGLOBINS

3.2.1. Überblick

Im Körper wird ständig in geringem Maße Methämoglobin gebildet, jedoch steigt dessen Gehalt im Blut normalerweise nie über die physiologische Grenze von 1% hinaus. Bei exzessiver Hb(III)-Bildung erfolgt eine rasche Reduktion zum funktionstüchtigen Hämoglobin. Die Reduktionssysteme sind aber ebenso fähig, Reaktionsprodukte der Hb(III)-Bildner, z.B. Nitrosobenzol, zu reduzieren, und führen so zu einem Kreisprozeß der Methämoglobinbildung (DANNENBERG u. KIESE 1950 b). Die Hb(III)-Rückbildung ist sehr eng mit dem Glukoseabbau verbunden, und zwar wird sie zum größten Teil durch die anaerobe Glykolyse und zu ca. 5 - 8% durch den Hexosemonophosphatshunt bestritten. Der H-Ionentransport erfolgt durch NADH und NADPH, die den endgültigen Hämiglobinreduktasen als Substrate dienen (MARTI 1963). KIESE beschrieb 1944 zwei verschiedene Enzymsysteme:

1. Die Diaphorase für die Übertragung des aus der Glykolyse stammenden Wasserstoffs,

2. die Hämiglobinreduktase für die Übertragung des aus Hexosemonophosphat gebildeten Wasserstoffs.

Auch Bakterien und Gewebsbrei sind zur Hb(III)-Reduktion fähig, wohl auf Grund ihres Glukosegehaltes. Die relative Aktivität und Bedeutung der verschiedenen Reduktionssysteme stellte JAFFE 1964 (zit. SCOTT et al. 1963) folgendermaßen, in absteigender Reihenfolge dar: NADH-abhängige Diaphorase: 23, Ascorbinsäure: 12, GSH: 9, NADPH-abhängige Hämiglobinreduktase: 6.

3.2.2. NADH abhängige Reduktion = Diaphorasesystem

Die in vitro sehr langsam verlaufende Reduktion von Hb(III) durch NADH wird in vivo durch die NADH-Oxydase (Diaphorase), wahrscheinlich ein Flavoprotein, katalysiert. Sie ist nucleotidspezifisch und hat mit NADH eine zehnmal stärkerere Wirksamkeit als mit NADPH. Für die in-vitro-Versuche ist die Anwesenheit eines Elektronenüberträgers nicht erforderlich. Das System kann durch p-Hydroxymercuribenzoat gehemmt werden (JAFFE 1964).

Mangel an Diaphorase bedingt eine rezessiv vererbliche Methämoglobinämie mit gestörter Hb(III)-Rückbildung und somit einer Akkumulation des Hämiglobins auf 20 - 40%. Der Gehalt der Erythrozyten an Katalase und NADH ist normal, der NADPH-Rückbildungsmechanismus ist intakt, jedoch nicht kompensationsfähig; dies kann aber durch Injektion von Methylenblau erreicht werden (MARTI 1963).

3.2.3. NADPH-abhängige Reduktion = Hämiglobinreduktasesystem

Die Reduktion von Hämiglobin durch NADPH in vitro ist nicht möglich, wird aber in vivo durch die NADPH-Oxydase (KIESE'S Hämiglobinreduktase) katalysiert (MARTI 1963). Dieses Enzym ist ein Hämprotein (KIESE 1957 zit v. JAFFE 1964 postuliert ein Flavoprotein) mit dem Molekulargewicht 185 000 und zwei prosthetischen Gruppen: einem Elektronenüberträger, der bei der Enzymdarstellung verloren geht und bei den in-vitro-Versuchen durch Methylenblau ersetzt werden muß, und einem Fe-Prophyrinkomplex (MARTI zit. HUENNEKENS 1957). Die Elektronenübertragung von NADPH auf Hb(III) geht also in zwei Schritten vor sich:

$$NADPH+H^+ \xrightarrow{e^-} e^-\text{-Überträger} \xrightarrow{e^-} \text{Häm des Ferments} \xrightarrow{e^-} \text{Hb (III)}.$$

NADPH ist außerdem wichtig für die Aufrechterhaltung der Stabilität der nativen Proteine der Zelle und der Zellmembran und zur Reduktion von Glutathiondisulfid. Die einzige Quelle zur Regeneration von NADPH innerhalb der roten Zelle stellt die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase dar, deren Gehalt mit zunehmendem Alter des Erythrozyten abnimmt (MARKS 1964).
NADH und NADPH vermögen Hb(III) auch ohne einen dazwischengeschalteten Elektronenüberträger zu reduzieren, doch belaufen sich diese Reaktionen wohl auf physiologisch unbedeutende Mengen (JAFFE 1964).

Glukose-6-phosphat-dehydrogenasemangel. Diese auch Primaquineüberempfindlichkeit (Amerika) und Favismus (Mittelmeerraum) genannte Krankheit wird unvollständig dominant an das X-Chromosom gebunden vererbt. Es erkranken hemizygote Männer und homozygote Frauen (ARGENTON 1966). 1 - 20% der mit dem Alter der Erythrozyten allerdings abnehmenden Enzymaktivität sind noch vorhanden. Durch eine Reihe exogener Substanzen (insgesamt 40), wie z.B. Genuß der Vicia-faba-Bohne, Einnahme von Malariamitteln, Antipyretica, Sulfonamiden, Vitamin K-Analogen, Chinin, aber auch durch Infekte wird 2 - 4 Tage nach der Applikation eine akute Hämolyse ausgelöst, die nach Elimination der alten Erythrozyten sistiert. Im anschließenden hämolysefreien Intervall ist der Patient klinisch gesund; die Erythrozytenlebensdauer ist jedoch immer verkürzt und die Neigung zu Innenkörpern erhöht (MARKS 1964, HENNEMANN 1964). Die Folge des Enzymmangels ist eine weitgehende Blockade des Pentosephosphatzyklus und damit ein geringer Gehalt der roten Zellen an NADPH, GSH und GSH-Peroxydase. Die Reduktion von Hämiglobin wird jedoch durch den NADH-abhängigen Mechanismus voll kompensiert. Bemerkenswerterweise sind die betroffenen Individuen widerstandsfähiger gegen Malariaplasmodien, da diese Erreger für ihr Wachstum eine gewisse GSH-Konzentration benötigen (MARTI 1963, MARKS 1964).

3.2.4. Glutathion

Dem Tripeptid Glutathion kommen im Erythrozyten verschiedene Funktionen zu:

1. Schutz des Hämoglobins vor Oxydation durch Bildung von gemischten Disulfiden; dies bedeutet zugleich Verlangsamung der Präzipitation von Hb. Auf dieser Reaktionsweise beruht vielleicht auch der Schutz von Enzymen und Membranproteinen.

2. GSH dient der Glutathionperoxydase als Wasserstoffdonator (ALLEN u. JANDL 1961).

3. Direkte Reduktion des Hb(III). Die Regeneration von reduziertem Glutathion ist durch die NADPH-abhängige GSH-Reduktase an den Hexosemonophosphatshunt gebunden.

3.2.5. Ascorbinsäure

Durch Ascorbinsäure ist die direkte Reduktion des Methämoglobins möglich, wobei sie in Dehydroascorbinsäure übergeht. Die Reaktion erfolgt in zwei Schritten über die Bildung eines Hb(III)-Ascorbinsäurekomplexes. Da Ascorbinsäure kaum in den Erythrozyten eindringt, ist die funktionelle Bedeutung nicht sehr groß. In Anwesenheit von Sauerstoff entstehen neben der Hb (III)-Reduktion noch Verdoglobine (HAUSCHILD 1961, KIESE 1944).

3.2.6. Reversibel oxydierbare Farbstoffe

Methylenblau, Thionin, Nilblau, Naphthochinon dienen als H_2-Acceptoren und Elektronenüberträger oft metabolischen Studien. In geringem Maße bilden sie Methämoglobin (vor allem im Hämolysat); diese Reaktionen kommen jedoch bei wenigen Prozenten schon zum Stillstand. Im intakten Erythrozyten erfolgt durch Methylenblau Hämiglobinrückbildung bis zu diesem Gleichgewicht. Durch direkte Reduktion von NADPH wird die Aktivität des Hexosemonophosphatshunts und damit das System der Hämiglobinreduktase immens gesteigert (JAFFE 1954, KIESE 1949 b). Darauf beruht der klinisch therapeutische Effekt der Methylenblauinjektion bei durch Diaphorasemangel oder toxisch bedingter Methämoglobinämie.

3.2.7. Rückbildungsgeschwindigkeit

Eine durch Arzneimittel oder deren Metaboliten ausgelöste Methämoglobinämie dauert nie länger als 12 - 24 Stunden nach Entfernung des offensiven Agens (JAFFE 1964 zit. BODANSKY 1951). Der Hb(III)-Gehalt kann innerhalb weniger Stunden bis auf schwer erkennbare Mengen, auch im entnommenen Blut und in der Leiche, abfallen (HEUBNER 1952-54). Bei einm Hb(III)-Gehalt über 2 g% ist die Reduktionsgeschwindigkeit unabhängig von der Hb(III)-Konzentration, und zwar werden bei 5 Mill. Erythrozyten pro mm^3 in der Stunde 3,2 g Hb(III) reduziert (KIESE 1947 b). Unter dieser Konzentration verläuft die

Reduktion bedeutend langsamer (HEUBNER et al. 1947). Die Aktivität der Reduktionssysteme hat ihre besondere Bedeutung für die Hb(III)-Bestimmung, wenn die Blutprobe nicht sofort nach der Entnahme gemessen wird. Weitere Faktoren, die Anwesenheit von oxydierendem und reduzierendem Material und die einsetzende spontane HB(III)-Bildung sind für die tatsächliche Größe der Reduktion mitbestimmend (HEUBNER u. STUHLMANN 1942). Interessant ist auch, daß bei Patienten mit Thyreotoxikose die Reduktion des Hb(III) schneller verläuft als bei euthyreoten Individuen (JAFFE 1964).

4. METHÄMOGLOBINBILDUNG

4.1. ALLGEMEINES ZUR METHÄMOGLOBINBILDUNG

4.1.1. Weitere Blutwirkungen von Methämoglobinbildnern

Auf Grund vorausgegangener Betrachtungen können Störungen des physiologischen Gleichgewichts zwischen Reduktion und Oxydation des Hämoglobins durch exogene Noxen, Anomalien des Hb und Enzymopathien der Erythrozyten bedingt sein. Durch seine komplizierte Struktur bietet das Hämoglobinmolekül eine Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten, wie Veränderungen am Globin, Oxydation des Eisens und des Porphyrinkerns, Aufspaltung des Porphyrinrings, Herausspaltung des Eisens usw. So ist es verständlich, daß die meisten Methämoglobinbildner sich nicht auf die reversible Oxydation des roten Blutfarbstoffs beschränken, sondern unter zusätzlicher Bildung von irreversiblen Produkten wie Heinz-Körpern und Verdoglobinen zu ausgedehnter Schädigung der Erythrozyten und damit zur hämolytischen Innenkörperanämie führen. In dieser Beziehung häufig erwähnte Medikamente sind u. a. Sulfonamide, Phenacetin, Antipyrin, Pyramidon, p-Aminosalicylsäure und verschiedene Malariamittel (ARGENTON 1966, HENNEMANN 1964, HEUBNER 1940). Oft tritt die Methämoglobinämie gegenüber den anderen toxischen Erscheinungen zurück. Dies gilt vor allem für chronische Vergiftungen, bei denen Anämie und Kumulation tiefergreifender Veränderungen am Häm und Globin im Vordergrund stehen (KIESE 1949 a, KUNZ 1942).

Die Prognose einer Methämoglobinvergiftung ist somit vom jeweiligen Methämoglobinbildner abhängig. Das Krankheitsbild ist am leichtesten und völlig reversibel bei Nitritintoxikationen, während durch Chlorat schwerste Erscheinungen hervorgerufen werden. Aromatische Verbindungen nehmen eine Zwischenstellung ein (LACHHEIM et al. 1960). Es ist durchaus möglich, in der chemischen Struktur einer Substanz, unter besonderer Berücksichtigung ihrer metabolischen Umwandlungsmöglichkeiten, eine Beziehung zu ihrer Toxizität auf den roten Blutfarbstoff zu finden. Genaue Angaben über quantitative

Metabolisierung und Wirkung sind aus den Übersichtsarbeiten von HEUBNER 1940, KIESE 1966, UEHLEKE 1964 a und WILLIAMS 1959 zu ersehen.

4.1.2. Wirkungsstärke und Wirkungsgröße der Methämoglobinbildner

Die oxydierende Wirkung einer Substanz ist nicht nur durch die applizierte Dosis, die Kinetik ihrer Resorption aus dem Intestinum, ihrer Metabolisierung zum Hb(III)-Bildner und Elimination, ihrer Verteilung auf die verschiedenen Gewebe des Organismus, sondern auch von der entgegenwirkenden Erhaltungsreaktion der Zelle, der Hb(III)-Reduktion bestimmt. Dieser ständige Eliminationsfaktor bewirkt eine Differenz zwischen Wirkungsgröße (Gesamtmenge des gebildeten Hb(III) und Wirkungsstärke (Erhöhung der Hb(III)-Konzentration im Blut) des Methämoglobinbildners. Die gemessene Hb(III)-Konzentration ist also die Resultante zwischen Hb(III)-Bildung und -Reduktion. Auf Grund der konstanten Reduktionsgeschwindigkeit über einer Konzentration von 2g% Hb(III) hängt die Kinetik der Hb(III)-Bildung davon ab, inwieweit dieser Vorgang überschritten wird (KIESE 1947 b).

4.1.3. Erythrozyten-Alter und Hb(III)-Bildung

MATTHIES beschrieb 1959, daß Retikulozyten Hb(III) schneller reduzieren als ausgereifte Erythrozyten. Diese Differenz ist besonders deutlich bei Zugabe von Glukose und Methylenblau und kann somit auf die NADPH-abhängigen Reduktionsmechanismen zurückgeführt werden. Da mit zunehmendem Alter der roten Zellen diese Enzymaktivität abnimmt, ist der höhere Hb(III)-Gehalt, den WALLER et al. 1959 (zit. von JAFFE 1964) in über 40 Tagen alten Erythrozyten fanden, durchaus erklärbar.

4.1.1. Methämoglobinbildung und Lebensalter

Die besonders große Neigung von Säuglingen und Frühgeborenen zu Methämoglobin- und hämolytischen Innenkörperanämien (v. a. durch Phenacetin, Acetanilid, Sulfonamide, Nitrat und Anilinfarben) beruht nicht auf einer größeren Empfindlichkeit des HbF gegenüber Oxydantien, sondern wahrscheinlich in einer funktionellen Unreife der Fermentsysteme für die Entgiftung in den

Lebermikrosomen (KLECKER 1949) und für die Hb(III)-Reduktion in den Erythrozyten (KÜNZER 1956). BETKE 1954 führt die schnellere Oxydierbarkeit des Nabelschnurblutes durch Nitrit und Ferricyanid auf eine raschere Dissoziation des oxygenierten HbF zurück, da die Oxydation nur am deoxygenierten Hämoglobin stattfinden kann.

4.1.5. Bedeutung der Tier- und in-vitro-Versuche

Aus Untersuchungen von Pharmaka an Tieren und in vitro kann nur bedingt auf Reaktionen im menschlichen Organismus geschlossen werden. Die Hb(III)-Bildung bei verschiedenen Species variiert auf Grund ihrer metabolischen Fähigkeiten, ihrer gesamten Stoffwechsellage und einer Reihe weiterer Faktoren. Durch die in-vitro-Versuche können einzelne Mechanismen, die ein kinetisches System beeinflussen, systematisch beleuchtet werden. Die Ergebnisse differieren aber von den Vorgängen im Organismus weitgehend, wie wir an den Wirkungen der direkten und indirekten Hb(III)-Bildner ersehen können. In den Hämolysaten treten noch weitere Faktoren, wie Beeinträchtigung der Reduktionssysteme und Freisetzung von Stromaenzymen in verschiedenem Ausmaß hinzu.

4.1.6. Alkohol und Methämoglobinämie

Durch Alkohol kann die Dauer einer Methämoglobinämie verlängert werden. Der Effekt ist jedoch bei den verschiedenen Hb(III)-Bildnern unterschiedlich, so daß eine Beeinflussung des vergiftenden Systems und nicht der Reduktionsmechanismen angenommen werden muß (HEUBNER 1940).

4.2. METHÄMOGLOBIN

4.2.1. Eigenschaften

Methämoglobin (die weiteren Bezeichnungen Hämiglobin und Ferrihämoglobin beziehen sich auf die Wertigkeit des Eisens) entsteht auf Grund einstufiger, reversibler Oxydation des Hämeisens, durch Verlust eines Elektrons, zur drei-

wertigen Stufe. Seine prosthetische Gruppe ist somit das Hämatin. Das Globin bleibt jedoch unverändert. In wässriger Lösung liegt Hb(III) als Metallhydroxyd vor und ist fähig, einfache und komplexe Salzu zu bilden (SCHWERD 1962). Auffallend ist der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf das chemisch-physikalische Verhalten des Methämoglobins: in saurer Lösung ist das Molekül positiv geladen, in alkalischem Milieu ist es entladen. Mit diesen Eigenschaften wechselt auch die Farbe von braun (bedingt durch das Hämiglobinion, JUNG und REMMER 1949) nach rot und dadurch das spektrale Verhalten. Die charakteristische Absorptionskurve des Methämoglobins erhält man bei leicht saurem pH (6,8) mit einem deutlichen Maximum bei 630 nm, welches bei Anstieg des pH zu Gunsten stärkerer Absorption im grünen Spektralbereich abnimmt. Durch die Oxydation des Eisens hat der rote Blutfarbstoff seine wichtigste physiologische Eigenschaft, dieFähigkeit zur Sauerstoffaddition verloren; daraus ergibt sich durch entsprechende Abnahme der Sauerstoffkapazität des Blutes (KIESE 1954) eine Hypoxie der Gewebe, die durch die ebenfalls methämoglobinbedingte Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve nach links noch beträchtlich verschlimmert wird (KIESE u. KLINGMÜLLER 1949). Die Lebensdauer der Erythrozyten wird durch Anwesenheit von Hb(III) aber nicht wesentlich beeinflußt (ALLEN 1964).

4.2.2. Der Hämiglobingehalt des normalen Blutes

Hb(III) ist ein völlig reversibles Umwandlungsprodukt des Blutfarbstoffs und wird in intakten Erythrozyten ständig und schnell zurückgebildet, so daß der Hämiglobingehalt des Blutes unter physiologischen Bedingungen nicht die Konzentration von 1% überschreitet. Der Hb(III)-Gehalt des normalen Blutes wurde von verschiedenen Autoren ermittelt:

HAVEMANN u. ISSEKUTZ 1939	bis 8 %
VAN SKLYKE 1946	0,36%
HEUBNER et al. 1947	0,7 %
REMMER 1956	ca. 0,5 %.

Extra corpore stellt Hb(III) allerdings die beständigere Form des Blutfarbstoffs dar. Es bildet sich spontan in verdünnten Blutlösungen; auch kristallisiertes Hb liegt meist als Hb(III) vor (HEUBNER 1940).

4.3. HÄMIGLOBIN-DERIVATE

Methämoglobin vermag eine ganze Anzahl von Salzen zu bilden, die in ihrem spektralen Verhalten voneinander und von Hb(III) selbst differieren: Cyanide, Sulfide, Azide, Rhodanide, Cyanate, Nitrite, Fluoride, Fulminate.

4.3.1. Cyan-Methämoglobin

Hb(III)CN, eine monomolekulare Verbindung des Cyanions mit dem dreiwertigen Eisen, stellt das stabilste Hb-Derivat dar. Es ist wochenlang haltbar und wird in Laboratorien häufig als Standardpräparat für Hb- und Hb(III)-Bestimmungen benutzt. Hb(III)CN ist reduzierbar, von roter Farbe und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 540 nm (SCHWERD 1962). Zu klinischer Bedeutung gelangt diese Verbindung bei Blausäurevergiftung, deren toxischer Effekt in der Bildung eines dissoziierbaren Komplexes mit der Cytochromoxydase und damit in der Blockierung der Zellatmung besteht. Auf Grund größerer Affinität des Cyanions zu Hb(III) als zu den Zellhäminen und der relativ geringen Toxizität des dadurch entstehenden Hb(III)CN kann durch Nitritinjektion herbeigeführte Methämoglobinämie weitgehende Entgiftung der Blausäure bewirken (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1966).

4.3.2. Nitrit-Methämoglobin

Das salpetersaure Salz des Hb(III) entsteht, wenn Nitrit in 50 bis 100fachem Überschuß auf Hb einwirkt. Die hellrote Farbe kommt dem nicht dissoziierten Molekül zu. Das spektrale Verhalten (Absorption bei 625 und 638 nm) ähnelt demjenigen des HbCO. Bei Zugabe von Na-Dithionit erfolgt schlagartiger Übergang in HbNO (JUNG u. REMMER 1949).

4.3.3. Methämoglobin-Sulfid

Methämoglobin-Sulfid entsteht oft postmortal durch H_2S-Entwicklung. Der rote Farbstoff besitzt im spektralen Verhalten Ähnlichkeit mit HbO_2 und stört damit die Hb(III)-Bestimmung im Leichenblut, in dem es die Bande bei 630 nm abschwächt (KIESE 1954).

4.3.4. Fluor-Methämoglobin

Hb(III)F ist eine braunrote monomolekulare Verbindung mit ähnlichem spektralen Verhalten wie das saure Hb(III), (Absorptionsmaximum bei 606 nm), aber zwischen pH 5 und 7 unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration (SCHWERD 1962).

4.4. VERDOGLOBINE

Wie schon erwähnt, entstehen durch zahlreiche Medikamente unabhängig von der Hb(III)-Bildung Verdoglobine. Sie sind eine Anzahl brauner bis grüner Pigmente, die teils oxydiert, teils denaturiert sind. Sie entstehen auch durch gleichzeitige Einwirkung von Reduktionsmitteln und molekularem Sauerstoff, wahrscheinlich über die intermediäre Bildung eines H_2O_2-Hb-Komplexes, in vitro. Durch Oxydation eines Brückenkohlenstoffatoms und dessen Eliminierung erfolgt die Sprengung des Porphyrinrings, auch die Seitenketten des Porphyrinkerns werden verändert. Die Verdoglobine besitzen ausgeprägte Absorptionsbanden zwischen 620 und 640 nm, welche bei Zusatz von Cyanid bestehen bleiben, bilden CO-Verbindungen und durch Zusatz von Pyridin entsprechende Hämochrome. Zugleich ist das leicht abspaltbare Eisen im Blut erhöht. Ausgesprochene Verdoglobinbildner sind Phenylhydrazin, 2,4-Diaminotoluol, Glykoldinitrat, Chlorat und m-Dinitrobenzol (KIESE 1942, KIESE u. SEIPELT 1942/43, KIESE 1948).

4.5. HEINZ-KÖRPER

Heinz-Körper werden als rundliche Gebilde am Rande der Erythrozyten durch Färbung mit Brillantkresylblau oder im Nativpräparat mittels Phasenkontrast nachgewiesen (GASSER 1954). Sie sind wie Verdoglobine irreversible Produkte bei verschiedenen Arzneimittelintoxikationen. Die spontane Heinz-Körperbildung in Neugeborenen-Erythrozyten ist aber nicht auf die höhere Empfindlichkeit gegenüber Medikamenten, sondern auf die strukturellen Eigenschaften der roten Zelle des Säuglings, möglicherweise auch auf den verminderten

Katalasegehalt zurückzuführen; denn Katalasehemmstoffe wie Azid rufen direkt Heinz-Körper hervor (KÜNZER 1956). Die Heinz-Körperbildung wird auf schwere strukturelle Schädigung des Erythrozyten vor allem auf oxydative Denaturierung des Membraneiweißes durch Blutgifte zurückgeführt. Es besteht aber kein ursächlicher Zusammenhang zwischen Hb(III)- und Heinz-Körperbildung, obwohl beide Produkte meist zugleich vorliegen (HAUSCHILD 1961, KIESE 1942, MOESCHLIN 1956). MOSER und KRAUSE 1950 beschreiben die oberflächennahe enzymreiche Proteinschicht der Erythrozyten, das Plasmolemm, als Ausgangspunkt der Heinz-Körperbildung. Es zeigen sich zunächst reversible Plasmolemmflecke, die dann in irreversible Heinz-Körper übergehen können. Direkte Heinz-Körperbildung wird durch Phenylhydrazin hervorgerufen, das lange Zeit zur Therapie von Polycythaemia vera appliziert wurde.

4.6. KLINISCHE SYMPTOME DER METHÄMOGLOBINÄMIE

Das auffälligste Zeichen der Methämoglobinämie ist eine Cyanose mit bräunlich-blaßgrau-lividem Hautkolorit und blauschwarzer Verfärbung der Schleimhäute und Akren. Die Cyanose wird bei einem Hb(III)-Gehalt des Blutes von 1,5 g% sichtbar und mit zunehmender Methämoglobinämie intensiver. Patienten mit einer Hb(III)-Konzentration bis 40% im Blut zeigen relativ wenig klinische Beschwerden. Ab 70% Hb(III)-Gehalt besteht Lebensgefahr. Stärkere Symptome sind Dyspnoe, Schwächegefühl, Kollapsneigung, Kopfschmerzen, Ohrensausen, Tachykardie und Erhöhung des Rest-N. Das EKG weist Zeichen der Hypoxie auf. Das Blut ist schokoladenbraun gefärbt. Als therapeutische Maßnahmen werden meist 50 - 100 mg Ascorbinsäure und 10 mg pro kg Toluidin- oder Methylenblau intravenös injiziert (ARGENTON 1966, BAADER 1957, BÜCH 1952, FILIPPINI 1965).

4.7. AUTOXYDATION

Spontane Hämiglobinbildung im Hämolysat ist eine unimolekulare Reaktion zwischen Hb und molekularem Sauerstoff. Die Geschwindigkeit wird in erster Linie vom Sauerstoffpartialdruck bestimmt. Das Maximum liegt bei einem pO_2 von 20 mm Hg entsprechend der Halbsättigung des Hämoglobins mit

Sauerstoff. Die Reaktion ist demzufolge von der Konzentration des deoxygenierten Hb als der funktionsfähigen Zustandsform abhängig. Neben der Eisenoxydation wird auch das Protein verändert (HUEBNER 1940, KIESE 1966).

4.8. WASSERSTOFFPEROXYD

Im aktiven Sauerstoff des Wasserstoffperoxyds oder in der Hemmung der Katalase besteht die Wirkungsweise zahlreicher indirekter Hb(III)-Bildner. Die Rolle des H_2O_2 als essentielles Intermediärprodukt ist jedoch noch nicht geklärt. Die Hb-Oxydation durch Röntgenstrahlen entsteht durch Bildung von H_2O_2, eventuell von einem OH^--Radikal, und ist proportional dem Katalasegehalt der roten Zelle (KIESE 1966).

4.9. ANORGANISCHE OXYDATIONSMITTEL

4.9.1. Kaliumferricyanid

Als dreiwertiges Anion oxydiert ein Molekül Ferricyanid streng stöchiometrisch ein Äquivalent Hb(II) zu Hb(III). Die Reaktion erfolgt mit deoxygeniertem Hb schlagartig, während sie im Hämolysat in vier Teilschritten verläuft: Assoziation und Dissoziation von HbO_2, Oxydation von Hb(II) und Reduktion des Ferricyanids. Limitierend für die Geschwindigkeit des Vorgangs ist die Dissoziation des HbO_2, die als langsamste Teilreaktion den formalen Ablauf bestimmt. Darauf beruht zum großen Teil die Reaktionsverschiedenheit der Species und die schnellere Oxydierbarkeit des HbF (BETKE et al. 1956 a). Physiologisch kommt dem Kaliumferricyanid keine Bedeutung zu, da es nicht in die Erythrozyten einzudringen vermag.

4.9.2. Ozon, Halogene, Permanganat

Diese Stoffe sind in vitro Blutgifte, gelangen aber kaum in den Körper. Neben äquimolaren Mengen Hb(III) bewirken sie auch Hämolyse. Chromatvergiftungen wurden öfters beobachtet (HEUBNER 1940).

4.9.3. Chlorat

Die Umsetzung des Chlorats, ein durch kleine Mengen Hb(III) in Gang gebrachter autokatalytischer Prozeß, ist in vivo und in vitro gleich. Nach der Methämoglobinbildung flockt das denaturierte Eiweiß aus oder gelatiniert. Die roten Zellen hämolysieren durch weiter fortschreitende Stromaschädigung (JUNG 1947 b). Hb-Schollen im strömenden Blut können Anurie durch Verlegung der Nierenglomerula bewirken (HEUBNER 1940).

4.10. ANORGANISCHE STICKSTOFFVERBINDUNGEN

4.10.1. Nitrit

In einer autokatalytischen Reaktion, dessen beschleunigendes Prinzip aber noch unklar ist, setzt sich Nitrit in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff mit Hämoglobin im Äquivalentverhältnis 1 : 2 um; bei dem Vorgang werden beide Reaktionspartner oxydiert. Die Reaktion läßt sich in zwei Phasen unterteilen: 1. eine in ihrer Dauer von der Nitritkonzentration abhängige Anlaufzeit, 2. rasche Hb(III)-Bildung, deren Geschwindigkeit mit der Wasserstoffionen- und Nitritkonzentration zunimmt (BETKE et al. 1956 b, JUNG u. REMMER 1949). Unter Ausschluß von Sauerstoff reagieren Nitrit und Hb jedoch unter Bildung von Hb(III) und HbNO. Bei großem Nitritüberschuß verbindet sich Hb(III) mit NO_2 zu Hämiglobinnitrit. HbNO und Hb(III)NO_2 bilden sich auch bei schweren Intoxikationen postmortal durch Sauerstoffmangel. In vivo (beim Hund) wird durch Applikation kleiner Mengen Nitrit eine größere Hb(III)-Ausbeute als durch höhere Dosierung erzielt - bis 5 Äq pro Mol NO_2 (KIESE u. SOETBEER 1949 b).

Nitritvergiftungen des Menschen werden relativ häufig beschrieben. BÜCH 1952 berichtet von einer Massenvergiftung durch nitrithaltige Wurstsuppe. In letzter Zeit häufen sich die Fälle von z.T. letalen Methämoglobinämien künstlich ernährter Säuglinge des ersten bis zweiten Rimenons. Das für ihre Nahrung verwendete Brunnenwasser enthielt Nitrat, das im Intenstinum zu Nitrit reduziert wird; dyspeptische Kinder werden schwerer betroffen (LACHHEIM et al. 1960, THAL et al. 1961, WERNER et al. 1965). Auch durch nitrathaltigen Spinat kann bei jungen Säuglingen Hämiglobinbildung hervorgerufen werden (SIMON 1966). Die Dosis letalis für erwachsene Menschen

beträgt 4g Natriumnitrit. Das toxische Krankheitsbild zeigt neben Methämoglobinämie Gefäßlähmung, Blutdruckabfall, aber keine Dyspnoe (MOESCHLIN 1956).

4.10.2. Ester der salpetrigen Säure

Die Giftigkeit von Amylnitrit, Äthylnitrat, Äthylnitrit, Nitroglykol und Nitroglycerin nimmt mit ihrer Hydrolysierbarkeit zu. Die Reduktion erfolgt durch Darmbakterien. Die Wirkungsstärke dieser Stoffe ist jedoch bedeutend geringer als diejenige des Nitrits (GROSS et al. 1942/43, PULINA 1942/43, WILHELMI 1942/43).

4.10.3. Hydroxylamin

Hydroxylamin ist ein direkter Hb(III) Bildner, der durch Hämoglobin als Katalysator in Stickstoff und Ammoniak dismutiert wird. Bei intravenöser Injektion (im Hundeversuch) erreicht die Hb(III)-Konzentration schon nach einer Minute den Höchstwert. Ein Mol Hydroxylamin bildet 0,6 Äq Hb(III). Die Hb(III)-Rückbildung verläuft sehr langsam, wohl auf Grund eines intermediär gebildeten Stoffes, so kommt die Gesamtwirkung des Hydroxylamins derjenigen äquimolarer Nitritmengen sehr nahe (KIESE u. MÜNCH 1950).

4.11. CHINON UND CHINOIDE SUBSTANZEN

4.11.1. Wirkungsmechanismen

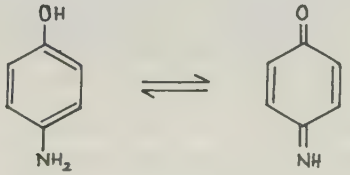
Im Körper bildet sich unter Steigerung des O_2-Verbrauchs ein Redoxsystem zwischen Chinon und Hydrochinon, mit Chinhydron als Zwischenpunkt, das mit Hb(II) und Hb(III) im Gleichgewicht stehen kann. Dieses ist vor der jeweiligen Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktionspartner und vom Einfluß des Sauerstoffs abhängig (HEUBNER 1940). Der katalytische Effekt der Redoxfarbstoffe beruht auf einer schnelleren Reaktion des Leukofarbstoffes mit Hb(III) als mit O_2 (bei einer optimalen Konzentration von 5×10^{-4}M). In höherer Dosierung verursachen sie Heinz-Körper und Hämolyse. Für die toxi-

sche Wirkung der chinoiden Substanzen wird auch intermediäre H_2O_2-Bildung postuliert. Auf diese Weise kann der bei Kindern beobachtete hämolytische Effekt von Menadion (2-Methyl-1, 4-naphthoninon) dem synthetischen Vitamin K erklärt werden (KIESE 1966).

4.11.2. Polyphenole

In Versuchen an Katzen durch JUNG und WITT 1947 bildeten Phloroglucin kein, Hydrochinon, Brenzkatechin, Resorcin schwach, Pyrogallol etwas mehr (bei hohen Dosen bis 40%) Hb(III). Das Vergiftungsbild wurde jedoch stärker durch Verdoglobinbildung beherrscht. GASSER berichtet 1954 von einer schweren hämolytischen Innenkörperanämie mit Hb(III)-Bildung bei einem mit Resorcinsalbe behandelten Säugling.

4.11.3. p-Aminophenol bildet auch in vitro Hb(III) und ist ein aktiver Metabolit von Anilin, Phenacetin, Acetanilid, Sulfonamiden u. a. m. Durch Bildung eines Chinoniminsystems entsteht ein katalytischer Kreis der Hb(III)-Bildung, wocurch mehrere Äquivalente Hb(III) durch ein Mol-p-Aminophenol gebildet werden können (KIESE 1966).



4.11.4. Phenylendiamin

Phenylendiamin bewirkt als Chinondiimin direkte Hb(III)-Bildung.

4.11.5. Chinoline

8-Amino-6-methoxychinolin ist die Muttersubstanz zahlreicher Malariamittel: Plasmochin, Primaquin, Pentaquin. Der Metabolit (entstanden durch Deme-

thylierung und Hydroxylierung) ist zwar therapeutisch stärker aktiv, aber zugleich durch Chinoniminbildung toxisch (WILLIAMS 1959). Schon in ganz geringen Dosen rufen 8-Aminochinolinderivate bei Patienten mit Glukose-6-phosphat-dehydrogenasemangel hämolytische Anämie hervor.

4.12. AROMATISCHE AMINE

4.12.1. Metabolismus der aromatischen Amine

Die aromatischen Amine werden viel in der Arzneimittelindustrie verwendet und gehören zu den häufigsten Hb(III)-bildenden Ursachen in vivo. Außer den Diaminen und Aminophenolen müssen sie aber alle metabolischen Änderungen unterworfen werden, um als aktive Agentien zu wirken. So entstehen Aminophenole, N-Hydroxyderivate und N-Oxyde, die in unterschiedlichem Ausmaß Methämoglobin sowie Tumoren hervorrufen.

Die Hydroxylierung am Ring zum Phenol (in vitro in Leberhomogenisaten durchführbar) ist in vivo irreversibel und begünstigt die Elimination der Substanz durch Konjugation mit Glucuronsäure. Die Metabolisierungsrate zum p- oder o-Derivat variiert mit den Species: Tiere (z.B. Hunde) mit niedrigem p/o-Quotienten weisen größere Empfindlichkeit gegen die toxischen Effekte der Aminophenole auf (WILLIAMS 1959). Unterschiede in der Positionshydroxylierung bestehen auch in der Geschlechtsdifferenz sowie in der Konfiguration der einzelnen Substrate (KIESE 1966).

Hydroxylierung am Stickstoff ist reversibel, oft werden die entstandenen Arylhydroxylamine sofort nach ihrer Bildung wieder reduziert. Die biochemische Umwandlung bewirken NADPH-abhängige mikrosomale Enzyme der Leber. Von der Geschwindigkeit der N-Hydroxylierung hängt zum großen Teil die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Hb(III)-Bildung ab (UEHLEKE 1964 a).

N Oxydbildung findet auch in den Lebermikrosomen statt. Die Enzymsysteme, die diese Reaktion katalysieren, sind mit denjenigen der Hydroxylierung jedoch nicht identisch. N-Oxyde sind Intermediärprodukte bei der schrittweisen Dealkylierung von tertiären und sekundären Aminen. Am bekanntesten ist das N,N-Dimethylanilin-N-oxyd, das in Anwesenheit von O_2, beschleunigt durch vorgebildetes Hb(III), Methämoglobin bildet (WILLIAMS 1959, UEHLEKE 1964 a).

4.12.2. Mechanismus der Methämoglobinbildung durch aromatische Amine

Die Aktivität von p-Aminophenol allein konnte die starke Hb(HI)-Bildung durch aromatische Amine nicht erklären. Die bedeutend stärkere Wirkung von Phenylhydroxylamin, welches zu Nitrosobenzol oxydiert und in roten Zellen durch Reduktion wieder aus diesem entsteht, hob LIPSCHITZ 1948 hervor und stellte die Hb(III)-Bildung durch Nitrobenzol und Anilin folgendermaßen dar:

$$R.NO_2 \xrightarrow{+H_2} R.NO \underset{+O}{\overset{+H_2}{\rightleftharpoons}} R.NHOH \xleftarrow{+O} R.NH_2$$

Blutgiftigkeit: - + +++ -

HEUBNER 1948 unterteilte diese Reaktionsfolgen noch durch die Interpolation eines Radikals (mit "4-wertigem Stickstoff"), welches er als eigentliches Oxydans (Aufnahme eines H^+-Ions aus dem Medium und eines Elektrons vom Hb-Eisen) des Hämoglobinmoleküls postulierte und damit dessen einstufige Oxydation erklärte:

$$R.NO \underset{+OH}{\overset{+H}{\rightleftharpoons}} R.NH.O \underset{+OH}{\overset{+H}{\rightleftharpoons}} R.NH.OH$$

Der genaue Mechanismus der Hb-Oxydation durch Arylhydroxylamine ist noch nicht ganz aufgeklärt. Verschiedene Autoren diskutieren auch intermediär entstandenes Wasserstoffperoxyd oder OH-Radikale und Hemmung der Katalase durch Phenylhydroxylamin (UEHLEKE 1964 a, KIESE 1966).

4.12.3. Phenylhydroxylamin und Nitrosobenzol

Im Hämolysat und in Suspensionen gewaschener Erythrozyten bildet Phenylhydroxylamin (nicht Nitrosobenzol) aus Hämoglobin in rascher gekuppelter Reaktion Hämiglobin und wird dabei selbst durch den katalytischen Effekt des Hb zu Nitrosobenzol oxydiert. Die Ausbeute des Hb(III) hängt von der Konzentration an Hb und Phenylhydroxylamin ab; bei dem Verhältnis Hb/Phenylhydroxylamin = 5 wird ein Äquivalent Hb(III) erzielt, mit fallendem Quotienten nimmt die Hb(III)-Bildung ab (KIESE u. D. REINWEIN 1950). Nach Zugabe von Glukose zu Erythrozytensuspensionen entwickelt sich unter starker Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Zelle ein Kreisprozeß der Hb(III)-Bildung, der in zwei Phasen unterteilt werden kann: 1. die gekoppelte Oxydation von Hämoglobin und Phenylhydroxylamin, 2. die Reduktion des Nitrosobenzols.

Auf diese Weise werden eine Vielzahl von Äquivalenten Hb(III) gebildet - bei einer optimal niedrigen Phenylhydroxylamin-Konzentration von 10^{-5}M/1 entstehen mehrere 100 Äquivalente Hb(III). Mit zunehmender Konzentration wird die mittlere Wechselzahl des Phenylhydroxylamins kleiner (DANNENBERG u. KIESE 1950 a, KIESE et al. 1950). Die Reduktion des Nitrosobenzols, dem limitierenden Faktor der Reaktionsgeschwindigkeit, erfolgt durch das Hämiglobinreduktasesystem und ist somit von der Aktivität der Glukose-6-phosphatdehydrogenase, dem NADPH-regenerierenden System abhängig. Mit der Zeit verlangsamt die Geschwindigkeit der Hb(III)-Bildung stark. Die Anfangsgeschwindigkeit ist proportional der Phenylhydroxylamin-Konzentration (DANNENBERG u. KIESE 1950 b, KIESE u. WALLER 1950, UEHLEKE et al. 1966, WAGNER u. BURGER 1966, WAGNER u. UEHLEKE 1966). In vivo geht die Reaktion in gleicher Weise vor sich, wird jedoch zusätzlich durch die Elimination und Art der Applikation beeinflußt. Nitrosobenzol ist ebenso, bei Verabreichung kleinerer Dosen sogar stärker wirksam als Phenylhydroxylamin. Dieser Effekt beruht auf der ständigen Reduktion geringer Mengen Hb(III) durch Phenylhydroxylamin (KIESE u. I. REINWEIN 1950, KIESE u. SOETBEER 1949 a, KIESE u. SOETBEER 1950). Die Bildung des dissoziierbaren Komplexes zwischen Hämoglobin und Nitrosobenzol wurde schon weiter oben erwähnt. Ein ähnlicher Kreisprozeß kann zwischen Benzylphenylhydroxylamin und Benzalphenylnitron gebildet werden (KIESE u. PLATTING 1958).

4.12.4. Anilin und Substitutionsprodukte

Injektion von Anilin bewirkt nie einen höheren Hb(III)-Gehalt im Blut als 30%. Bis zu dieser Konzentration zeigt die Dosis-Wirkungskurve einen treppenförmigen Anstieg und verläuft dann parallel zur Abszisse (HEUBNER 1940). Die Ausbeute von 2,5 Äq Hb(III) pro Mol Anilin kommt den aktiven Metaboliten p- und o-Aminophenol und vor allem Phenylhydroxylamin zu. Zum Teil wird Anilin ungeändert ausgeschieden (JUNG 1947 a, WILLIAMS 1959).

Einführung von Substituenten führt zur Wirkungssteigerung oder -abnahme (sterische Hinderung) von Anilin. Im allgemeinen bewirkt Nitro- und Cl-Substitution Erhöhung, zunehmende Methylsubstitution und vor allem N-Alkylierung (HOLZER u. KIESE 1960) Abschwächung der Fähigkeit von Anilin, Hb(III) zu bilden. Toluidine sind etwas stärker wirksam als Anilin (HEUBNER 1940).

4.12.5. Acetanilid (Antifebrin)

Acetanilid gleicht in seiner Wirkung stark dem Anilin und wird heute kaum noch therapeutisch verwendet. Bei einer Dosis von 1 g treten schon starke Vergiftungserscheinungen und Somnolenz auf (MOESCHLIN 1956). Durch Ringhydroxylierung entsteht das analgetisch wirksame Angens, p-Acetamidophenol, durch Deacetylierung Anilin als Vorläufer der Hb(III)-Bildner Phenylhydroxylamin und p-Aminophenol (WILLIAMS 1959).

4.12.6. Phenacetin (Acetophenetidin)

Diese Substanz ist weniger toxisch als Acetanilid, mit dem es p-Acetamidophenol als antipyretisch, analgetisch wirksamen Metaboliten gemeinsam hat. Aus einem kleinen Teil des applizierten Phenacetins entsteht durch Deacetylierung am Stickstoff p-Phenetidin, das durch weitere Metabolisierung zu p-Aminophenol zum Hb(III)-Bildner werden kann (WILLIAMS 1959 zit. BRODIE u. AXELROD 1949). Die Kombinationspräparate Treupel®-, Spalt®-, Geloni-da®- und Saridon®-Tabletten, enthalten neben Phenacetin noch Coffein und Sedativa. Sie können zur Sucht, dem chronischen Phenacetinabusus ("Saridonismus") führen. Die toxischen Folgen der chronischen Vergiftung betreffen vor allem drei Organe: 1. das Blut durch Hb(III)-und Verdoglobinbildung, hämolytischer Innenkörperanämie und Retikulozytose, 2. das Nervensystem durch ausgedehnte neurovegetative Störungen, 3. die Niere durch interstitielle Nephritis mit tubulärer Schädigung (Phenacetinniere) (MOESCHLIN 1957).

4.12.7. Sulfonamide

Die Derivate des Sulfanilamids (p-Aminobenzolsulfonamid) werden hauptsächlich durch Acetylierung der aromatischen Aminogruppe (N^4), Hydroxylierung am Benzolring und Modifikation der R-Gruppe metabolisiert (WILLIAMS 1959). Hydroxylierung an der N^4-Aminogruppe zu p-Hydroxysulfanilamid, dem toxischen Stoffwechselprodukt der Sulfonamide kann auch in vitro mit Lebermikrosomen in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff durchgeführt werden. Dieser Metabolit ist ähnlich wie Phenylhydroxylamin zu schneller Hb(III)-Bildung in vivo und vitro befähigt. Die größte toxische Wirkung entfalten die Sulfonamide Sulfanilamid, Sulfapyridin, Sulfathiazol, Sulfadiazin und das gegen Lepra wirksame 4,4'-Diaminodiphenylsulfon (THAUER et al. 1965 a, b, c).

Auf Verdoglobin- und Heinz-Körper-Bildung durch Sulfonamide wurde schon oben hingewiesen. Besonders häufig werden bei Säugulingen Cyanosen durch Sulfonamide, auch durch die an sich weniger toxischen Langzeitpräparate, beobachtet. Durch ungenügende Acetylierung kommt es zu toxischen Blutspiegelwerten trotz niedriger therapeutischer Dosen. Eine Rolle kann auch die Unreife der Hb(III)-Reduktionssysteme im Säuglingserythrozyten spielen (FRIEDERISCICK u. TOUSSAINT 1960, KLECKER 1949, NISSLER u. THAL 1963).
Eines der ersten Sulfonamide, das Prontosil, möge als Beispiel für die hydrolytische Spaltung der Azofarbstoffe zu aromatischen Aminen dienen (WILLIAMS 1959).

4.12.8. Karzinogene Wirksamkeit der aromatischen Amine

Die N-Hydroxylierungsprodukte der polyzyklischen aromatischen Amine 2-Naphthylamin, 2-Aminofluoren, 4-Aminostilben und Benzidin sind direkt karzinogen und bilden Methämoglobin. Die beiden verschiedenen biochemischen Vorgänge sind also auf dieselbe Struktur zurückzuführen (KIESE 1966). Durch Spaltung der Konjugate dieser Substanzen in Blase oder Darm (WILLIAMS 1959) und durch ihre Bindung an Gewebsproteine (UEHLEKE 1964 b) entsteht die lokal-karzinogene Wirkung.
Eine Übersicht über Allergisierung und Polyneuropathien durch aromatische Stickstoffverbindungen gibt UEHLEKE 1964 a.

4.13. AROMATISCHE NITROVERBINDUNGEN

4.13.1. Reduktion zu wirksamen Methämoglobinbildnern

Methämoglobinämie durch aromatische Nitroverbindungen wird langsamer hervorgerufen als durch Aniline, ist aber von längerer Dauer. Ihre Toxizität im Organismus hängt von der Geschwindigkeit ihrer Reduktion (über Hydroxylamine zu Aminen) und Exkretion ab. Langsam eliminierte Stoffe werden viel reduziert und sind damit von starker Giftwirkung (WILLIAMS 1959). Die Reduktion der Nitroverbindungen findet in verschiedenen Organen, hauptsächlich in der Leber statt; bei peroraler Einnahme oft schon durch Darmbakterien.

Über das Vorhandensein einer spezifischen Nitroreduktase herrscht noch Unklarheit, wahrscheinlich ist ein Flavinenzym unmittelbar beteiligt (UEHLEKE 1964 a).

4.13.2. Nitrobenzol und Substitutionsprodukte

Nitrobenzol ist schwächer wirksam als Anilin, wirkt durch dieselben Metaboliten, wird aber langsam eliminiert. Vergiftungssymptome sind Hb(III)- und Heinz-Körper-Bildung, Anämie, Krämpfe und Temperaturerniedrigung. Zunehmende Methylsubstitution schwächt, Nitro- und Chlor- (vor allem p-) Substitution verstärkt die Wirkung des Nitrobenzols auf den Blutfarbstoff (BREDOW u. JUNG 1942/43, HAAS 1947). Die Toxizität einiger Süßstoffe (1-Alkoxyl-2-amino-nitrobenzole) wies KIESE 1949 c an verschiedenen Tieren nach. Bei Applikation größerer Dosen entstanden Methämoglobin, Heinz-Körper, Anämie und Lebernekrosen.

4.13.3. Polynitrobenzole

Polynitrobenzole werden meist nur an einer Nitrogruppe reduziert (WILLIAMS 1959). Unter den Nitroaromaten zeigen Dinitrobenzole die stärkste Wirksamkeit als Hb(III)-Bildner. Methämoglobinämie wird am schnellsten durch die p-Verbindung hervorgerufen, während das m-Isomer durch seine lange Verweildauer im Körper in stärkerem Ausmaß Heinz-Körper, Anämie, Leberschädigungen und zentrale Lähmungen und Krämpfe hervorruft (KIESE 1949 a, KUNZ 1942). Trinitrobenzol zeigt ein ähnliches Vergiftungsbild (JUNG 1947 a). Intoxikationen mit den für die Sprengstoffindustrie wichtigen Dinitrotoluolen und Trinitrotoluol (TNT) werden relativ häufig beobachtet. Die Vergiftung erfolgt auch durch Inhalation und percutan (WOLF u. DÖRING 1960). Sie sind stärkere Hb(III)-Bildner als Nitrobenzol; Nebenwirkungen wie bei den Dinitrobenzolen treten jedoch erst bei höherer Dosierung auf (BREDOW u. JUNG 1942/43). Die als Insektizide und Herbizide angewendeten Dinitrophenole bilden im Organismus in geringem Maße Methämoglobin. Besondere Bedeutung kommt dem 2,4-Dinitrophenol zu. Diese Verbindung ist auf den roten Blutfarbstoff unwirksam, verursacht aber durch Hemmung der biologischen Phosphorylierungsprozesse Entkopplung der Zellatmung und damit hochgradige Hyperthermie (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1966).

4.13.4. Nitrofuranderivate

Arzneimittel wie Furacin®, Furmethid®werden im Körper extensiv metabolisiert und dabei eventuell reduziert (WILLIAMS 1959 zit. PAUL et al. 1949).

4.13.5. Parathion (p-Nitrophenyl-diäthyl-thionophosphat)

ENDERS und GRUPP zeigten 1951 in Versuchen an Ratten, daß Parathion (E 605) im Blut ein ähnliches Vergiftungsbild hervorruft wie Nitrobenzol. Dieser Effekt ist auf die rasche Metabolisierung des Giftes zurückzuführen.

5. NACHWEIS DES METHÄMOGLOBINS

5.1. HAUTKOLORIT UND METHÄMOGLOBINKONZENTRATION

Manchmal entspricht das klinische Erscheinungsbild der Cyanose nicht dem tatsächlich gemessenen Methämoglobingehalt des Blutes. Dies kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein:

5.1.1. Derivate des Blutfarbstoffs

Die rote Farbe von Stickoxyd-Hämoglobin und Methämoglobin-Nitrit und -Sulfid verleiht den vergifteten Individuen ein recht blühendes Aussehen, das zur Verwechslung mit einer Kohlenmonoxydvergiftung Anlaß geben kann. Ausbleiben der Cyanose und fehlende Absorption der hergestellten Blutlösung im charakteristischen Spektralbereich des Methämoglobins beweist also nicht unbedingt dessen Abwesenheit (HEUBNER 1952-54).

5.1.2. Verdoglobine

Das Ausmaß der Cyanose kann durch Anwesenheit von Verdoglobinen merklich vergrößert sein. Die Bande der Verdoglobine ist gegenüber derjenigen des Methämoglobins etwas ins Langwellige verschoben und wird bei Cyanid-Zusatz nicht ausgelöscht. Sie werden nach Zugabe von KCN für die Hb(III)-Bestimmung nach der Cyanidmethode durch Überführung in ihre CO-Verbindung bei 610 nm gemessen (KIESE 1942).

5.1.3. Sauerstoffdissoziation

MOSER und KRAUSE beschrieben 1950 Cyanose bei sulfonamidbehandelten Patienten ohne nachweisbare Methämoglobinämie. Sie erklärten diese klinische

Erscheinung durch Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve nach rechts (d.h. Halbsättigung des Hb erst bei höherem Sauerstoffdruck), Erhöhung des Diffussionsgefälles für O_2 durch vermehrten Sauerstoffbedarf der Gewebe und langsameren Durchfluß des sauerstoffarmen Blutes durch die subpapillären Plexus auf Grund einer Erweiterung der kapillären Strombahn.

5.1.4. Farbstoffe

Nach EVELYN und MALLOY 1939 kann das Blut auch durch blaue oder purpurfarbene Sulfonamidderivate dunkel gefärbt sein. Derartige Stoffe wurden aber bis jetzt noch nicht isoliert (UEHLEKE 1964 a zit. GAEDE u. KIESE 1942).

5.2. REDUKTION UND SPONTANOXYDATION ALS FEHLERMÖGLICHKEITEN DER Hb(III)-BESTIMMUNG

Besteht ein zeitliches Intervall zwischen Entnahme einer Blutprobe und deren Hb(III)-Nachweis kann sich der tatsächliche Methämoglobin-Gehalt in starkem Ausmaß verändern und so zu einer Fehlbestimmung führen.

5.2.1. Reduktion

Der bedeutendste Faktor ist in der schnellen Reduktion des vorhandenen Hb(III) zu suchen, die auch noch in vitro einige Zeit bestehen bleibt. Um dennoch einen der aktuellen Methämoglobinämie entsprechenden Hb(III)-Wert zu erhalten, ist es erforderlich, die Rückbildung des Hb(III) nach Möglichkeit auszuschalten: 1. Da die Reduktionssysteme durch Hämolyse ihre Wirksamkeit verlieren (ZIPF 1950), kann man durch Verdünnung des Blutes sofort nach der Entnahme die Hb(III)-Konzentration weitgehend konstant erhalten. Nach SCHWERD 1961 genügt schon eine Verdünnung des Blutes mit Wasser im Verhältnis 1 : 6 für die Konstanz des Hb(III)-Gehaltes über eine Zeitspanne von 48 Stunden. 2. Zugabe von Natrium-Fluorid (100 mg in ein Venülengläschen) hemmt die Aktion der Reduktionssysteme. Die Hb(III)-Konzentration kann so tagelang auf demselben Niveau gehalten werden.

5.2.2. Spontanoxydation

Bleibt entnommenes Blut längere Zeit stehen, verlieren die Reduktionsmechanismen als Gegenspieler der Spontanoxydation ihre Aktivität. So kommt es zu Kumulation von Hb(III). In der nativen Blutprobe stellen pH (Geschwindigkeitsminimum der Spontanoxydation bei physiologischem pH 7,4) und Plasma noch einen gewissen Oxydationsschutz dar. Durch Hämolyse werden die Reduktionssysteme weiter abgeschwächt oder ganz unwirksam. In wenigen Stunden können sich beträchtliche Mengen Hb(III) bilden. Die Geschwindigkeit der Reaktion ist eine exponentiale Funktion der Zeit (beschleunigte Anfangsphase) und ist stark vom Verdünnungsgrad der Blutlösung abhängig. Unterhalb einer Hb-Konzentration von 2 g% nimmt sie rapide zu. ZIPF 1950 gibt folgendes Beispiel: in einem Hämolysat aus gewaschenen menschlichen Erythrozyten mit einer Hb-Konzentration von 1,38 g% bilden sich bei pH 7,35 und 37° Celsius in einer Stunde 6 %, in drei Stunden 11 %, in fünf Stunden 23 % Hb(III). Es ist also ungeheuer wichtig, die Untersuchung hergestellter Meßlösungen in möglichst geringem Zeitabstand zur Hämolyse durchzuführen. Zur Verhinderung der Spontanoxydation einer Blutprobe empfiehlt SCHWERD 1961 CO-Sättigung und kühle Aufbewahrung, da sich der stabile HbCO-Komplex relativ resistent gegenüber oxydativen Einflüssen verhält.

5.3. VERSCHIEDENE NACHWEISMETHODEN

Aus der Literatur sind eine ganze Anzahl von Methämoglobinbestimmungsmethoden bekannt. Die Prinzipien der gebräuchlichsten Methoden sollen kurz erläutert werden.

5.3.1. Grüne Kohlenmonoxydmethode

Dieser Nachweis des Methämoglobins beruht auf der Extinktionsdifferenz zwischen Hb(III) und HbCO im grünen Spektralbereich bei leicht saurem pH. Durch Einleiten von Kohlenmonoxyd in die Blutlösung bildet sich aus sämtlichem zweiwertigen Hämoglobin HbCO, während Hb(III) unverändert bleibt. Zugegebenes Na-Dithionit bewirkt dessen Reduktion und auf Grund des im Hämolysat physikalisch gelösten Kohlenmonoxyds dessen Übergang in HbCO. Dadurch

ergibt sich eine Extinktionszunahme gegenüber der Lösung ohne Dithionitzusatz. Die Messung erfolgt bei 546 nm im Photometer Eppendorf oder bei 568 nm im Spektralphotometer (KIESE 1947 a). Bei der roten Kohlenmonoxydmethode wird die Extinktionsabnahme bei 630 nm nach Überführen von Hb(III) in HbCO gemessen.

5.3.2. Cyanidmethode

Zugabe von Cyanid zu einer Blutlösung bewirkt die Auslöschung der Bande des sauren Hb(III) bei 630 nm, da das entstandene Hb(III)CN im roten Spektralbereich eine geringere Absorption aufweist. Das in der Meßlösung vorhandene Hämoglobin reagiert nicht mit dem Cyanidion (EVELYN and MALLOY 1938, HAVEMANN et al. 1939). THAUER et al. 1966 messen die Extinktionszunahme des Hb(III)CN gegenüber Hb(III) im grünen Spektralbereich bei 550 nm. Gleichzeitig verwenden sie CO-gesättigtes Wasser zur Hämolyse, um Spontanoxydation auszuschalten.

5.3.3. Hb(III)-Bestimmung nach HORECKER und BRACKETT

Dieser Methode liegt die Extinktionsdifferenz zwischen alkalischem Hb(III) und Hb(III)CN bei 800 nm zugrunde, die sich nach Zugabe von Cyanid zu einer Hb-Lösung ergibt. Mit Boratpuffer ist die Meßlösung auf ein pH von 9,4 eingestellt (HORECKER and BRACKETT 1944).

5.3.4. Hb(III)-Bestimmung nach AUSTIN und DRABKIN

Die Extinktion einer Lösung hämolysierter gewaschener Erythrozyten wird nach Zugabe von KCN im Vergleich zu einer Hb(III)CN-Lösung bei den Wellenlängen 630, 575, 560 und 540 nm bestimmt (AUSTIN and DRABKIN 1935).

5.3.5. Quotientenmethode nach HÜFNER-HEILMEYER und MULLER-ZIJLSTRA

Die Blutprobe wird mit 0,05 %iger bzw. 0,0016 %iger Ammoniaklösung verdünnt. Anschließend werden die Quotienten Ext. $\frac{576}{560}$ und Ext. $\frac{560}{590}$ (HÜFNER-

HEILMEYER) und Ext. $\frac{558}{523}$ (MULLER-ZIJLSTRA) durch Messung der Extinktion bei den betreffenden Wellenlängen gebildet (SCHWERD 1962).

5.3.6. Fluoridmethode

Dieser Hb(III)-Nachweis beruht auf der Extinktionsdifferenz zwischen chlorid- und fluoridhaltigem Blut von pH 6,9 bei 606 nm (HAVEMANN et al. 1939).

5.3.7. Fehlermöglichkeiten der Hb(III)-Bestimmung

Von den erwähnten Nachweismethoden für Methämoglobin gelangen die grüne Kohlenmonoxydmethode und die Cyanidmethode am häufigsten zur Anwendung. Folgende Faktoren sollten bei ihrer Ausführung beachtet werden:
Erythrozytenstromata stören die Hb(III)-Messung dadurch, daß durch zugegebene Zusätze wie Dithionit und Cyanid eine Änderung ihrer Lichtdurchlässigkeit bedingt wird (KIESE 1947 a).
Dithionit ruft in saurer und neutraler Lösung Trübungen durch Abscheiden von kolloidalem Schwefel hervor. 2 - 3 mg Dithionit reichen zur Reduktion einer Hb-Lösung von 4 ml aus. Der Trübungseffekt ist vor allem für Messungen im langwelligen Bereich von Bedeutung, da auf Grund der niedrigen Extinktionskonstante der Blutfarbstoffe die Empfindlichkeit in dieser Beziehung größer ist (KURZ und WALLER 1954/55).
Cyanid bewirkt Aufhellung einer kolloidalen Lösung durch Verschiebung des pH ins Alkalische. Dadurch kann ein höherer Hb(III)-Gehalt vorgetäuscht werden. Durch ausreichende Pufferkonzentration (nicht unter 0,02 m Endkonzentration) läßt sich diese Eigenschaft des Cyanids ausschalten.
Bei der Hb(III)-Bestimmung ist die Einhaltung des pH von 6,8 streng erforderlich, da schon geringe Alkalisierung eine Veränderung der spektralen Eigenschaften von Hb(III) bewirkt.
Detergentien, an Hand von Kern- und Schmierseife 1960 von SCHWERD und KECK beschrieben, können zu Hb(III)-Bildung führen. Deshalb ist auf sorgfältige Reinigung der verwendeten Gefäße zu achten.
Saponin und Harnstoff erweisen sich ungünstig zur Trübungsbeseitigung, da durch Saponin Verdoglobin entsteht und durch Harnstoff in kurzer Zeit meßbare Hb(III)-Mengen auftreten (KIESE 1942).

6. AUSFÜHRUNG DER NACHWEISMETHODEN

6.1. MATERIALIEN

Folgende Substanzen wurden verwendet: Konz. Ameisensäure (98 %), Hydroxylamin, Kaliumcyanid, Kaliumferricyanid, prim. Kaliumphosphat (nach Sörensen), Natriumchlorid, Natriumdithionit, sek. Natriumphosphat (nach Sörensen), konz. Schwefelsäure (98 %); alles p.A.-Reagentien der Fa. Merck; Glukose (Dextropur®, Maizena), kristallisiertes Hämoglobin, Liquemin® (Roche): Ampullenflaschen à 5 ml mit 25000 I.E. Heparin.

0,2 M Phosphatpuffer nach Sörensen pH 6,8
0,1 M Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4
Die Pufferlösungen wurden am elektrischen pH-Meter genau eingestellt.

Waschlösung für Erythrozyten: 9 Teile 0,9 %ige NaCl-Lösung, 1 Teil 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4; auf 1 Liter Waschlösung wurde 1 g Glucose gegeben. 10 %ige K-Ferricyanid-Lösung wurde im Abstand von 14 Tagen jeweils frisch angesetzt.
5 %ige KCN-Lösung wurde jeden dritten Tag erneuert.

Kohlenmonoxyd wurde im Wehrlikolben durch tropfenweise Zugabe von konz. Ameisensäure zu konzentrierter, leicht erwärmter Schwefelsäure hergestellt.

Blut wurde erwachsenen Personen mit Venülen® (15 ccm) aus einer Armvene entnommen und sofort mit zwei Tropfen Liquemin® (1 : 5 mit Aqua dest. verdünnt) versetzt. Es wurde nie älteres alf fünf Stunden altes Blut verwandt.

Alle Messungen wurden am Beckmann DK-2A-Spektrophotometer durch Aufzeichnung einer Absorptionskurve zwischen 700 und 500 nm durchgeführt.

6.2. AUFZEICHNUNG DER SPEKTRALBILDER

Zum Verständnis der später durchgeführten Nachweismethoden wurden zunächst die Spektren der in Frage kommenden Hb-Derivate und die Differenzkurven zwischen Hb(III) und HbCO sowie zwischen Hb(III) und Hb(III)CN aufgezeichnet. Die verwendete Blutlösung (1 : 200) wurde nach der Arbeitsvorschrift für die Kohlenmonoxydmethode (s. d.) angefertigt.

Für die Genauigkeit der Hb(III)-Bestimmung soll die Extinktionsdifferenz der beiden gegeneinander gemessenen Blutfarbstoffe am Meßpunkt möglichst groß sein. Aus den Spektralbildern ist es ersichtlich, daß die Differenz zwischen

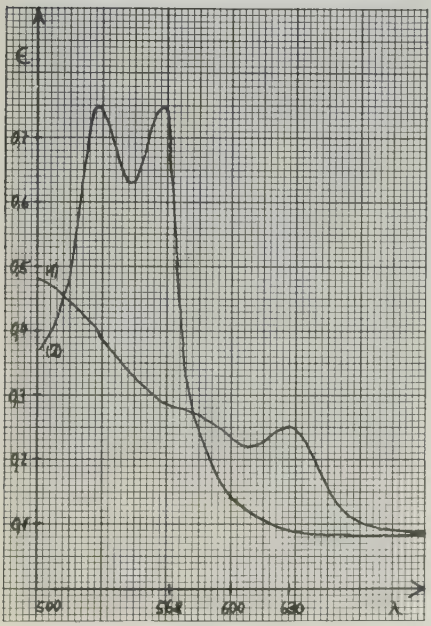


Abbildung 1:
Absorptionsspektrum von
Hb(III) (1) und HBCO (2)

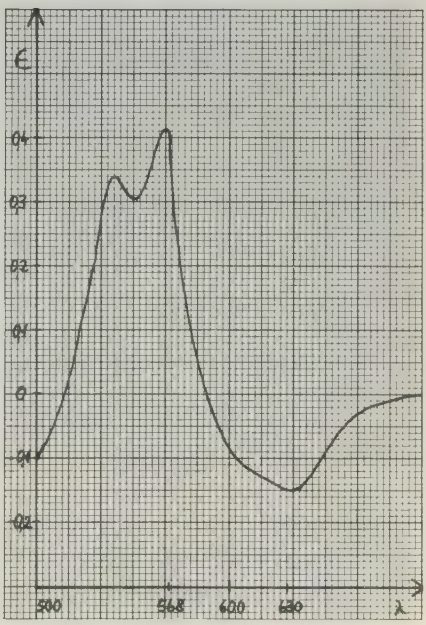


Abbildung 2:
Differentialkurve von
Hb(III): Vergleichsküvette und
HbCO: Meßküvette

HbCO und Hb(III) im grünen Spektralbereich in dieser Beziehung die beste Voraussetzung zur exakten Messung bietet; deshalb wurde zunächst die auf diesem Prinzip beruhende Kohlenmonoxydmethode angewendet. Die Größe der Extinktion kann aber auch durch erhöhte Farbstoffkonzentration gesteigert werden (monochromatisches Licht muß allerdings immer gewährleistet sein). Bei der Cyanidmethode ist die Meßlösung gegenüber derjenigen der Methode nach KIESE ca. 4fach konzentriert. Dies gestattet eine ausreichende Genauigkeit der Differenzmessung zwischen Hb(III) und Hb(III)CN bei 630 nm. Einen beinahe doppelt so großen Unterschied in der Extinktion weist die Differenzkurve zwischen Hb(III) und Hb(III)CN im grünen Spektralbereich auf. Eine Messung bei 550 nm begünstigt auf diese Weise vor allem die Bestimmung niedriger Hb(III)-Konzentrationen.

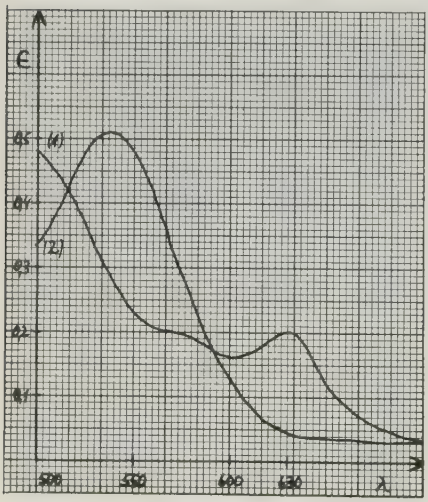


Abbildung 3:
Absorptionsspektrum von
Hb(III) (1) und Hb(III)CN (2)

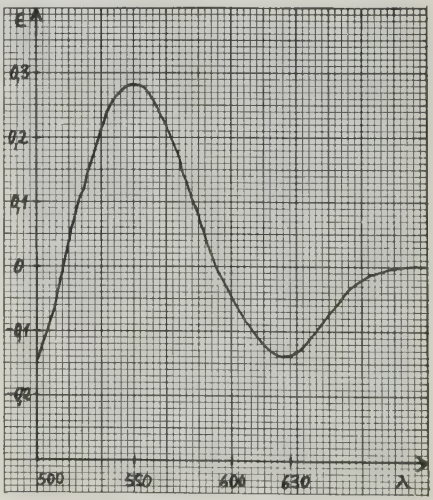


Abbildung 4:
Differentialkurve von
Hb(III): Vergleichsküvette und
Hb(III)CN: Meßküvette

Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für das spektrale Verhalten von Hb(III) soll in den folgenden Absorptionskurven von alkalischem (Blut mit 0,05 %iger Ammoniaklösung verdünnt) und saurem Hb(III) gezeigt werden:

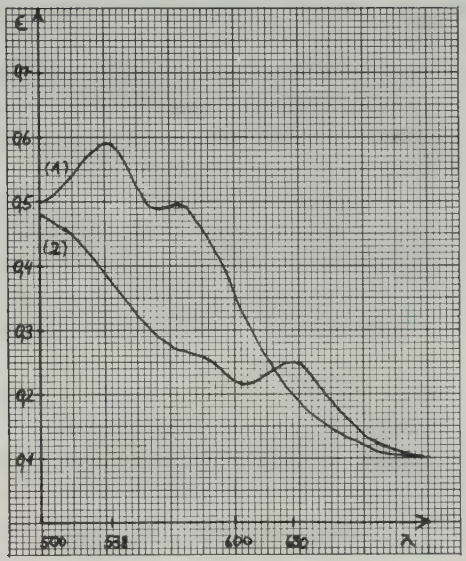


Abbildung 5:
Absorptionsspektrum von alkalischem (1)
und saurem Methämoglobin (2)

6.3. VERSUCHE MIT KRISTALLISIERTEM Hb UND K-NITRIT

Von einer Lösung aus kristallisiertem Hämoglobin pH 6,8 (die Verdünnung erfolgte so weit, bis die Extinktion in den optimalen Ablesebereich des Geräts fiel) wurde ein Spektralbild erhalten, das undeutlich die Maxima des sauren Hb(III) aufwies. Die verwaschenen Absorptionskurven, die diese Lösung lieferte, beruhte auf ihrer starken Trübung, die durch Filtrieren nicht zu beseitigen war. Zugabe von K-Ferricyanid und K-Nitrit sowie Durchleiten von CO bewirkte keine Änderung des Spektralbildes, während durch zugefügtes Dithionit das Spektrum von reduziertem Hb entstand. Gab man einige Kristalle K-Nitrit (eine Lösung exakter Molarität konnte nicht hergestellt werden, da die Substanz sehr hygroskopisch war) zu einer Blutlösung (1 : 200 ver-

dünnt), erhielt man das Spektrum von alkalischem Hb(III). Wurde dieser Probe Dithionit zugesetzt, so wies das Spektralbild die spezifischen Maxima von $Hb(III)NO_2$ und HbNO auf.
Mit kristallisiertem Hb führten wir keine weiteren Versuche durch, da uns die Substanz auf Grund der nicht zu beseitigenden Trübung in der davon angefertigten Lösung für unsere Zwecke nicht geeignet erschien.

6.4. KOHLENMONOXYDMETHODE

6.4.1. Ausführung

0,5 ml Blut werden zu ca. 60 ml Aqua destillata pipettiert und zur vollständigen Hämolyse 5 Minuten stehen gelassen, bis die Lösung lackfarben ist. Dann werden 10 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben und mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt (Verdünnung 1 : 200). Die Lösung wird geteilt: Probe A zur Bestimmung des Hb(III)-Gehaltes, Probe B zur Bestimmung des Gesamthämoglobins als 100 %igem Bezugswert. Durch Probe A wird 10 Minuten CO-Gas durchgeleitet (Hb(II) → HbCO, Hb(III) unverändert). Mit dieser Lösung werden 2 Küvetten (d = 1 cm) gefüllt, deren Extinktionen im Spektrophotometer gegeneinander abgelesen werden. Es darf sich dabei keine Extinktionsdifferenz zeigen. Nach Beschicken der vorderen Küvette mit einigen Körnchen Dithionit (Hb(III) → Hb(II) → HbCO) wird die Extinktion bei 568 nm bestimmt: E_1.
Probe B wird mit einigen Tropfen einer 10 %igen K-Ferricyanidlösung versetzt (sämtl. Hb → Hb (III)), mit Co gesättigt und dann auf dieselbe Weise wie Probe A gemessen: E_2.

$$\underline{\text{Berechnung:}} \quad \frac{E_1}{E_2} \times 100 = \% \text{ Hb(III)}$$

6.4.2. Herstellung einer Verdünnungsreihe

Um eine annähernd 100 %ige Hb(III)-Lösung (ohne überschüssig vorhandenes K-Ferricyanid) zu erhalten, wurden je 100 ml Hämolysat (Verdünnung 1 : 200) mit abfallenden Mengen einer 10 %igen K-Ferricyanidlösung versetzt:

A : 0,15 ml K-Ferricyanid
B : 0,10 ml K-Ferricyanid
C : 0,05 ml K-Ferricyanid
D : 0,04 ml K-Ferricyanid
E : 0,03 ml K-Ferricyanid
F : 0,02 ml K-Ferricyanid

Die erhaltenen Spektralbilder waren von Probe A bis E identisch, während Probe F einen Abfall der Extinktion bei 630 nm zeigte. Anschließend wurde Probe E (entsprach ungefähr 100 % Hb(III)) mit nicht oxydiertem Hämolysat derselben Hb-Konzentration verdünnt (1 + 9), (2 + 8), (3 + 7), ... und die Spektren der betreffenden Lösungen aufgezeichnet (Differenzmessung nach der Kiese-Methode).

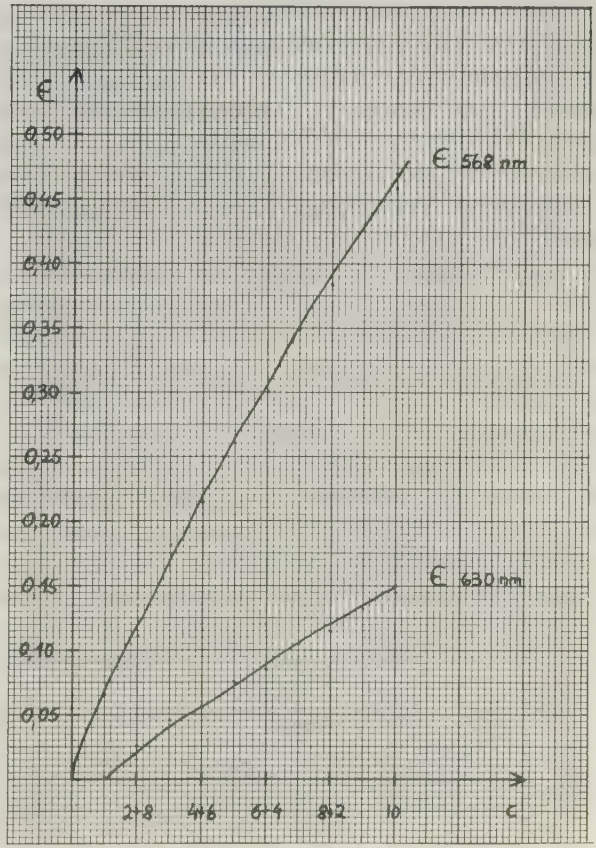


Abbildung 6:
Extinktionsergebnisse der Verdünnungsreihe

Leider wurde bei diesen Versuchen nicht von zwei 100 %igen Lösungen ausgegangen. Dies betrifft vor allem das Hämolysat, das zur Verdünnung der Hb(III)-Lösung verwendet wurde und möglicherweise schon Methämoglobin enthielt. So kann uns das Extinktionsergebnis dieser Verdünnungsreihe nicht den genügenden Aufschluß über das Ausmaß der Hb(III) Konzentration der gemessenen Lösungen geben.

6.4.3. Versuche zur Ausschaltung der Hb(III)-Leerwerte

Trotz genauer Beachtung der Vorschrift wurden selbst in frisch entnommenem Blut Hb(III)-Werte bis 21,5 % erhalten. Es wurde nun versucht, Fehlermöglichkeiten im methodischen Vorgehen auszuschalten:
pH-Änderungen und deren Beseitigung: Überleiten und Durchleiten von Kohlenmonoxyd durch die Blutlösung bewirkte eine Verschiebung des pH ins Saure (pH 6,8 → 4,5). Dieser Effekt wurde dadurch ausgeschaltet, daß das frisch hergestellte Kohlenmonoxyd durch Natronlauge anstatt durch Schwefelsäure geleitet wurde, um beigemengte Schwefelsäuredämpfe abzufangen. Zugabe von wenigen Körnchen Dithionit bewirkte eine pH-Änderung von 6,8 nach 5 in der Meßküvette. Offenbar war die Substanz schon etwas zersetzt, denn bei Verwendung von frischem Dithionit hielt sich die Wasserstoffionenkonzentration konstant. Blieb die Blutlösung einige Zeit (1/4 bis 1/2 Stunde) in hellem Licht (Sonne) stehen, so veränderte sich die Farbe des 100 %igen Hb(III)-Lösung von braun nach rot, d.h., die Lösung wurde alkalisch. - Sonnenlicht ist bei Blutfarbstoffbestimmungen also unbedingt zu meiden.
Trübungseffekte durch Dithionit wurden durch Zugabe ganz geringer eben noch ausreichender Mengen dieser Substanz ausgeschlossen.
Alle verwendeten Gefäße und Pipetten wurden besonders gründlich gereinigt, um Hb(III)-Bildung durch Detergentien zu vermeiden. Das mit Venülen entnommene Blut war des öfteren leicht hämolysiert. Für die folgenden Versuche wurde Blut mit Recordspritzen abgenommen und sofort mit Heparin versetzt. Die Hb(III)-Werte änderten sich dadurch nicht.
Sämtliches zur Hämolyse und für Kochsalz- und Pufferlösungen verwendete dest. Wasser wurde ca. 15 Minuten gekocht und dann filtriert, wobei ein grauer Niederschlag zurückblieb. In vergleichenden Untersuchungen mit frisch entnommenem Blut ergab sich ein frappanter Unterschied:

Wasser, nicht gekocht: 21,5 % Hb(III)
Wasser, gekocht: 3,0 % und 4,3 % Hb(III)

Messung der Hb(III)-Konzentration nach Hämolyse in frisch hergestelltem CO-

Wasser ergab keine niedrigeren Werte als 3 %. Am wirkungsvollsten bei dem Bemühen um einen physiologischen Hb(III)-Wert war das Abkochen und Filtrieren des verwendeten dest. Wassers. Auf diese Weise wurde eine minimale Hb(III)-Konzentration von 3 % erzielt. Da der Grund dieser pathologischen Hb(III)-Werte unklar blieb und es nicht gelang, ihn auszuschalten, wurden die Versuche mit dieser Methode abgebrochen.

6.5. CYANIDMETHODE (550 nm)

Ausführung: Die Messung erfolgt in zwei Schritten: 1. Für die Methämoglobinbestimmung werden 0,2 ml Blut zu 10 ml CO-gesättigtem dest. Wasser pipettiert. Nach vollständiger Hämolyse wird 1 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 zugegeben und die Lösung dann auf zwei Küvetten (d = 1 cm) verteilt, die im Spektrophotometer eine gegen die andere abgelesen werden. Die Extinktion muß gleich Null sein. Nun wird die vordere Küvette mit einem Tropfen 5 %iger KCN-Lösung versetzt und der Inhalt gut durchmischt (Hb(III) → Hb(III) CN, HbCO unverändert). Die Messung erfolgt bei 550 nm: E_1. 2. Für die Gesamtblutfarbstoffbestimmung als 100 %igem Bezugswert werden 0,1 ml Blut in 10,0 ml Aqua dest. (enthält kein CO) hämolysiert und mit 2 bis 3 Tropfen einer 10 %igen K-Ferricyanidlösung versetzt (sämtl. Hb → Hb(III)). Nach Zugabe von 1 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 erfolgt die Messung wie bei der Hb(III)-Bestimmung: E_2.

$$\text{Berechnung: } \frac{E_1}{E_2} \times 50 = \% \text{ Hb(III)}$$

Der Hb(III)-Nachweis einer Blutprobe, deren Hb(III)-Konzentration über 50 % geschätzt wird, erfolgt wie die Messung des Gesamblutfarbstoffs (mit CO-haltigem Wasser), um im optimalen Ablesebereich des Geräts zu bleiben. Jede Bestimmung wird zur Kontrolle zweimal vollständig durchgeführt. Es ist außerdem darauf zu achten, daß die Vergleichsküvette und deren Inhalt nicht mit KCN in Berührung kommen, da schon geringe Mengen KCN das Extinktionsergebnis beeinflussen können.

Im Differenzbild wurden bei der Untersuchung frisch entnommener Blutproben zunächst leicht negative Werte erhalten, die auf das zugegebene KCN (Verschiebung des pH ins Alkalische) zurückzuführen waren und durch Zentrifugieren des Hämolysats (Entfernung der Erythrozytenstromata) weitgehend

ausgeschaltet werden konnten. Die Verdünnung der Meßlösung durch KCN wurde durch Zugabe von 1 Tropfen H_2O in die Vergleichsküvette ausgeglichen. Im Gegensatz zur CO-Methode wurde in frisch entnommenem Blut kein Hb(III) nachgewiesen. Die Cyanidmethode war somit die Methode der Wahl für die späteren Metabolitenversuche.

6.6. ANFERTIGUNG EINER EICHKURVE FÜR DEN Hb(III)-NACHWEIS NACH DER CYANIDMETHODE

Prinzip: Hämoglobin setzt sich stöchiometrisch mit K-Ferricyanid um. Durch Zugabe steigender Mengen einer K-Ferricyanidlösung von bekannter Konzentration kann aus der jeweiligen Extinktionsdifferenz die gebildete Hb(III)-Menge berechnet werden.

Anfertigung der Hb-Lösung: Heparinisiertes Vollblut wurde 10 Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert und das Serum abgesaugt. Die Erythrozyten wurden zweimal bei 1800 und zweimal bei 2200 U/min je 10 Minuten in gepufferter und mit Glukose versetzter physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und der Überstand vorsichtig dekantiert. Es wurde darauf geachtet, daß auch die Leukozyten, die als dünne Schicht über dem Erythrozytenbrei lagen, mit abgesaugt wurden. Dann wurden 0,5 ml Erythrozytenmasse in 50 ml H_2O hämolysiert. Nach Zugabe von 5 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 6,8 wurde die Lösung zur Abtrennung der Erythrozytenstromata 15 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Der Überstand ergab eine hochgereinigte Hb-Lösung.

Berechnung und Ausführung: Die zur normalen Hb(III)-Bestimmung angefertigte Meßlösung ist wie folgt zusammengesetzt:

0,2 ml Vollblut (oder Erythrozytensuspension)
10,0 ml H_2O
1,0 ml Puffer
11,2 ml Hb-Lösung (Probe A),

das entspricht einem Verdünnungsfaktor von 11,2 : 0,2 = 56. Wird die Hämoglobinkonzentration des verwendeten Blutes auf 15 g% geschätzt, so ist die Hb/4-Molarität (bezogen auf 1 Fe^{++} und MG 16800) von Probe A $1,594 \times 10^{-4}$ M. Eine äquimolare K-Ferricyanidlösung (MG 329,26) enthält 52,48 mg dieser Substanz pro Liter (Lösung B).

Eichreihe: Der Küvetteninhalt beträgt 3,4 ml; gegenüber Probe A liegt also ein Verdünnungsfaktor von 3,4 : 3 = 1,132 vor.

E_1: 3,0 ml Probe A
0,1 ml Lösung B
0,3 ml H_2O

E_2: 3,0 ml Probe A
0,2 ml Lösung B
0,2 ml H_2O

E_3: 3,0 ml Probe A
0,4 ml Lösung B

Um Eichwerte für höhere Hb(III)-Konzentrationen zu erhalten, wird für die Fortsetzung der Eichreihe Lösung B 4fach konzentriert verwendet: Lösung C (209,92 mg/l). Damit wird eine stärkere Verdünnung der Meßlösung vermieden; der Verdünnungsfaktor bleibt also gleich.

E_4: 3,0 ml Probe A
0,1 ml Lösung C ($\hat{=}$ 0,4 ml Lösung B)
0,3 ml H_2O

E_5: 3,0 ml Probe A
0,2 ml Lösung C
0,2 ml H_2O

E_6: 3,0 ml Probe A
0,4 ml Lösung C

Berechnung der gebildeten Hb(III)-Menge: In der Küvette sind 0,1 ml $1{,}594 \times 10^{-4}$ M K-Ferricyanid in 3,4 ml Gesamtinhalt enthalten. Das sind absolut $1{,}594 \times 10^{-8}$ Mol K-Ferricyanid, die äquimolare Mengen Hb(III) bilden. Dann ist die Hb(III)-Konzentration in der Küvette

$$\frac{1{,}594 \times 10^{-5}}{3{,}4} \text{ M}$$

und die Hb(III)-Konzentration im Vollblut (oder Suspension) bei der angewandten Verdünnung

$$\frac{1{,}594 \times 10^{-5} \times 56}{3{,}4} \text{ M}$$

Umgerechnet auf die wirkliche Molarität (auf 4 Fe^{++} bezogen) ergibt sich

$$\frac{1,594 \times 10^{-5} \times 56}{3,4 \times 4} \text{ M}$$

oder in g%

$$\frac{1,594 \times 10^{-5} \times 56 \times 6720}{3,4 \times 4}$$

$$= \frac{5,99854080}{13,6}$$

$$= 0,441069$$

Der Extinktionsunterschied, der durch die Zugabe von 0,1 ml $1,594 \times 10^{-4}$ M K-Ferricyanid zu der angefertigten Meßlösung entsteht, entspricht also 0,441069 g% Hb(III).

Ergebnisse: Extinktionen bei 550 nm

	1. Eichreihe	2. Eichreihe	
E_1	0,032	0,043	
E_2	0,049	0,069	$E_2 - E_1 = \Delta E_1$
E_3	0,095	0,107	$E_3 - E_2 = \Delta E_2$
E_4	0,103		
E_5	0,208	0,200	$E_5 - E_4 = \Delta E_3$
E_6	0,402	0,411	$E_6 - E_5 = \Delta E_4$

Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige dekadische lineare Abhängigkeit der Hb(III)-Bildung zur zugegebenen K-Ferricyanidmenge. Die ΔE-Werte ergaben das Bild der endgültigen Eichkurve: Abbildung 7 (S. 53).

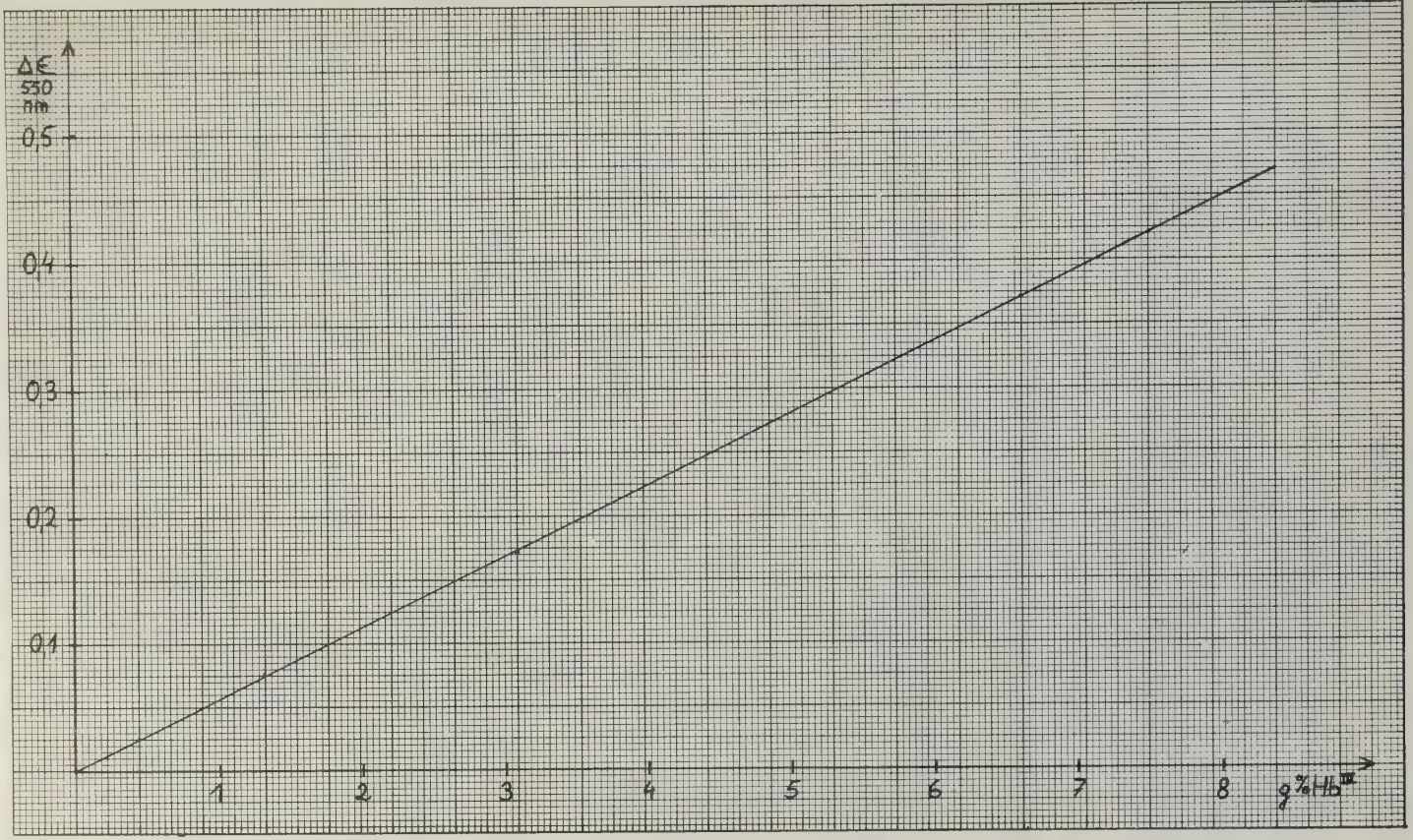
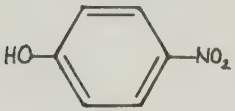
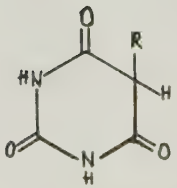


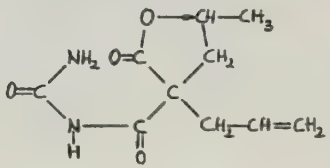
Abbildung 7

7. UNTERSUCHUNGEN ÜBER METHÄMOGLOBINBILDUNG DURCH VERSCHIEDENE ARZNEIMITTELMETABOLITEN

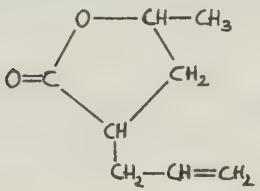
7.1. VERWENDETE METABOLITEN ODER ARZNEIMITTEL

Arzneimittel (oder Gift)	Stoffwechselprodukte
Phenolderivate:	
Phenacetin	p-Aminophenol
Acetanilid	
E 605	p-Nitrophenol
	
Barbitursäurederivate:	
	
Evipan®	5-Monomethylbarbitursäure R = CH_3

Arzneimittel	Stoffwechselprodukte
Veronal®	5-Monoäthylbarbitursäure
Phanodorm®	R = C_2H_5
Neodorm®	5(1-Methyl)-propylbarbitursäure
	R = $CH(CH_3)C_2H_5$
Luminal®	5-Monophenylbarbitursäure (theoretisch)
	R = C_6H_5
Axeen®	α-Allophanyl-α-allyl-γ-valerolacton

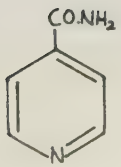


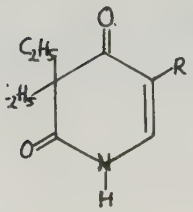
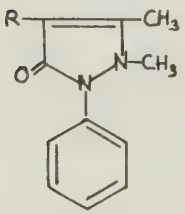
Axeen®	α-Allyl-γ-valerolacton



Pyridinderivat:

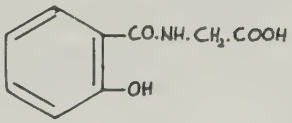
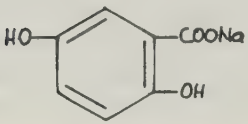
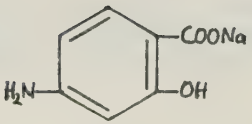
i-Nicotinsäureamid	



Arzneimittel	Stoffwechselprodukte
Piperidinderivate:	
Noludar®	4, 6-Dioxo-5, 5-diäthyltetrahydronicotinsäure R = COOH
Noludar®	4, 6-Dioxo-5, 5-diäthyltetrahydronicotinaldehyd (Noludaraldehyd, hypothetisch) R = CHO
Noludar®	Hydroxymethyl-pyrithyldion R = CH_2OH
Noludar®	Methyl-pyrithyldion R = CH_3
Pyrazolonderivate:	

Arzneimittel	Stoffwechselprodukte
Pyramidon®	4-Aminophenazon R = $-NH_2$
Pyramidon®	4-Acetylaminophenazon R = $-NH.CO.CH_3$

Salicylsäurederivate:

Aspirin®	Salicylursäure 
Aspirin®	Na-Gentisinat 
Aminox® = p-Aminosalicyl-säure als Na-Salz	

Die Strukturformel der verwendeten Substanzen ist oben aufgezeichnet. Die Substanzen wurden in wenig Aceton gelöst und mit Aqua dest. bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Bei 4,6-Dioxo-5,5-diäthyltetrahydronicotinsäure, Noludaraldehyd und Salicylursäure wurden zur vollständigen Lösung einige Tropfen gesättigter Sodalösung hinzugegeben. Methylpyrithyldion konnte nicht gelöst werden.

7.2. HÄMOLYSATANSÄTZE

Zunächst prüften wir die oben erwähnten Substanzen auf ihre Fähigkeit, im Hämolysat Hb(III)-Bildung hervorzurufen. Wir gingen dabei folgendermaßen vor: Frisch entnommenes heparinisiertes Blut wurde dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, jeweils 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Ein Ansatz enthielt:

4 ml Hämolysat (pH 6,8; Hb^{++}-Endkonzentration ca. 1/1100 M)

1 ml Metabolitenlösung (Endkonzentration ca. 1/110 M = $9,09 \times 10^{-3}$ M)

Die Metabolitenkonzentration betrug also das Zehnfache der Hämkonzentration. Die Ansätze wurden 1 1/4 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert und dann der Hb(III)-Gehalt mit der Kiese-Methode bestimmt. Außerdem wurde das Spektralbild gegen Wasser aufgezeichnet.

Als Probesubstanz diente Hydroxylamin, mit dem Hb(III)-Werte von 77 und 79,5 % erzielt wurden. Die Versuchsergebnisse aus den Ansätzen mit allen übrigen verwendeten Substanzen überstiegen die Extinktion der Leerwerte, die einen Hb(III)-Gehalt zwischen 13 und 30 % Hb(III) aufwiesen, nie.

Diese extensiv hohen Leerwerte sind wohl am ehesten dadurch begründet, daß wir bei den Messungen mit der Kiese Methode auch in frisch entnommenem Blut meßbare Hb(III) Konzentrationen nachwiesen und trotz unseres Bemühens um eine genaue und fehlerfreie Methodik nie einen niedrigeren Hb(III)-Wert a ls 3 % erzielten. Weiterhin mag durch die Verdünnung des Blutes in den Ansätzen die Neigung des Hämoglobins zu Spontanoxydation gefördert worden sein. Außerdem wäre es möglich, daß bei der Hämolyse durch die Freisetzung von Stromaenzymen andere Bedingungen für die Reduktions- und Oxydationsvorgänge in der Lösung geschaffen wurden. Die letzterwähnten störenden Faktoren waren bei den folgenden Versuchen mit heparinisiertem Vollblut nicht gegeben.

7.3. VOLLBLUTANSÄTZE

Ein Ansatz enthielt:

1,8 ml heparinisiertes Vollblut

0,2 ml Metabolitenlösung (Endkonzentration: 5×10^{-3} M).

Nach 1 1/2 Stunden Inkubation im Wasserbad bei 37° C wurde die Hb(III)-Be-

stimmung nach der Kiese-Methode durchgeführt. Es ergaben sich Hb(III)-Werte von 10 %. Die Ergebnisse aus den mit Metaboliten inkubierten Ansätzen waren mit dem Leerwert identisch. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Hb(III)-Konzentrationen von 15 % erzielt. - Auch hier diente Hydroxylamin als Probesubstanz. Es ergaben sich bei der Messung nach 30 Minuten 53 % Hb(III) und nach 90 Minuten 48 % Hb(III). Bemerkenswert ist, daß Hydroxylamin in zehnfacher Verdünnung (Endkonzentration: 5×10^{-4} M) keine Oxydation des Blutfarbstoffes hervorrief, während im Hämolysat bei gleichem Konzentrationsverhältnis zwischen Häm und Hydroxylamin sofort Hb(III) gebildet wurde. Um die Reduktion eventuell gebildeten Methämoglobins auszuschließen, wurden die Vollblutansätze 1/2, 1 und 1 1/2 Stunden nach der Inkubation gemessen, wobei sich identische Werte von 9 % Hb(III) ergaben. Möglicherweise liegen im Serum Faktoren vor, die das Hämoglobin vor allem bei intakten Erythrozyten vor der Oxydation schützen.

Um die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen exakt miteinander vergleichen zu können, ist es erforderlich, für alle Versuche eine konstante, reproduzierbare Ausgangssituation zu schaffen. Es ist aber denkbar, daß der Blutzuckergehalt der verschiedenen Blutproben, die für die Vollblutansätze verwendet wurden, variierte. Auf diese Weise können jeweils andere Stoffwechselbedingungen geschaffen werden, die das Gleichgewicht der Hb-Zustandsform zwischen Oxydation und Reduktion beeinflussen. Deswegen führten wir unsere endgültigen Versuche mit Erythrozytensuspensionen durch, die uns eine konstante Glukose- und Wasserstoffionenkonzentration garantierten.

7.4. ERYTHROZYTENSUSPENSIONEN

Die gelösten Substanzen wurden einer Suspension gewaschener Erythrozyten zugesetzt: Ein Ansatz enthielt (Endkonzentration):

1,0 ml Erythrozytenmasse ($\hat{=}$ ca. 10^{-2} M Hb bezogen auf 1 Fe^{++})
0,8 ml Suspensionsmedium (0,12 M NaCl, 0,011 M Glukose, 0,026 M Phosphatpuffer pH 7,4)
0,2 ml Metabolitenlösung (5×10^{-3} M)

Die Endkonzentration der Metaboliten entsprach ungefähr einer 100 mg%igen Lösung; damit ist der toxische Blutspiegelwert durchaus erreicht bzw. überschritten.

1 ml gewaschener Erythrozyten wurde zu 0,8 ml Suspensionsmedium pipettiert und 15 Minuten im Wasserbad bei 37° C vorinkubiert. Nach Zugabe von je 0,2 ml Metabolitenlösung wurden die Ansätze 1 Stunde lang im Wasserbad bei 37° C unter Luft inkubiert und zeitweilig geschüttelt. Der Hb(III)-Nachweis wurde zunächst nach der Kiese-Methode durchgeführt.

In sämtlichen Ansätzen überstiegen die Hb(III)-Werte (außer bei Hydroxylamin 5×10^{-3} M) nie den Leerwert von 10 % Hb(III). Der Ansatz mit 5×10^{-4} M Hydroxylamin in Endkonzentration wurde sofort nach der Inkubation etwas bräunlich, nach kurzer Zeit aber war die Farbe mit dem hellroten Kolorit der anderen Ansätze identisch, ebenso die gemessene Hb(III)-Konzentration.
In parallel laufenden Versuchen war die Hb(III)-Konzentration im Leerwert bei der Erythrozytensuspension höher (15 %) als bei den Vollblutansätzen (10 %). Der Einfluß von Hydroxylamin wirkte sich bei beiden Versuchsanordnungen jedoch gleich aus:

5×10^{-4} M ——— 10 bzw. 15 % Hb(III)
5×10^{-3} M ——— 47,6 % Hb(III)

Der höhere Leerwert, der in den Erythrozytensuspensionen erzielt wurde, läßt sich vielleicht auf eine gewisse Schädigung der roten Zellen beim Waschvorgang zurückführen.
Um aber eventuell gebildete geringe Hb(III)-Mengen zu messen, verließen wir den Hb(III)-Nachweis mit der Methode nach Kiese und bestimmten den oxydierten roten Blutfarbstoff nach der Cyanidmethode bei 550 nm, wobei die Leerwerte nie die eben noch physiologische Konzentration von 1 % Hb(III) überschritten. Extinktionen dieser Größe fallen noch in die Fehlerbreite.

7.5. ERGEBNISSE

Methämoglobin wurde nur von p-Aminophenol und Natriumgentisinat gebildet:

Substanz	Molarität im Ansatz	% Hb(III)
p-Aminophenol	5×10^{-3} M	60 %
		56,2 %
p-Aminophenol	5×10^{-4} M	13,5 %
p-Aminophenol	5×10^{-5} M	2,6 %
Na-Gentisinat	5×10^{-3} M	5,3 %
		6,5 %

Der Hb(III)-Gehalt im Ansatz mit den übrigen Metaboliten überstieg nie den höchsterreichten Leerwert von 1 % Hb(III).

8. DISKUSSION

In unseren Versuchen überprüften wir eine Reihe von Arzneimittelmetaboliten, und zwar Phenol-, Barbiturat-, Pyrazolon-, Piperidin- und Salicylsäurederivate sowie i-Nicotinsäureamid auf ihre Fähigkeit, in einer Erythrozytensuspension in vitro den roten Blutfarbstoff zu Methämoglobin zu oxydieren. Aus der Literatur ist uns eine ganze Anzahl von Substanzen bekannt, aus deren Konfiguration diese Wirkung auf das Hämoglobin durchaus ersichtlich ist. Es handelt sich um aromatische Amino- und Nitroverbindungen und gewisse Chinonabkommlinge. Unsere Ansätze mit p-Aminophenol bestätigten dessen bekannte Eigenschaft als Hb(III)-Bildner, die sich durch einen Chinoniminmechanismus erklären läßt. Selbst in Konzentrationen von 5×10^{-5} M erhielten wir noch einen meßbaren Hb(III)-Wert. Das positive Ergebnis, das wir in den Versuchen mit Na-Gentisinat erzielten, wird uns durch die Fähigkeit dieser Substanz zur Chinonbildung verständlich, da sich zwei Hydroxylgruppen in para-Stellung am Ring befinden. In vivo wird diese Eigenschaft aber nicht zu allzugroßer Bedeutung gelangen, da wohl selten ein Blutspiegelwert von ca. 100 mg% (entsprechend der Konzentration in den Versuchsansätzen) entstehen wird.

Die Überprüfung der übrigen Metaboliten auf ihre Fähigkeit zu einer eventuellen Hb(III)-Bildung lieferte uns Ergebnisse, die durchaus mit den bisher in der Literatur beschriebenen Intoxikationen übereinstimmen. Wir inkubierten die Substanzen in einer Konzentration von 5×10^{-3} M und hielten uns so bewußt im Bereich eines toxischen Blutspiegels von ca. 100 mg%. Selbst da ergab sich keine nennenswerte Hb(III)-Bildung, wie wir schon aus der Konfiguration dieser Stoffe vermuteten. Man sollte jedoch diese Substanzen in ihrer Beziehung zum roten Blutfarbstoff nie aus dem Auge verlieren, da FILIPPINI 1965 interessanterweise einen Fall von Doridenintoxikation beschrieb, wobei eine Methämoglobinämie von 44,5 % bestand. Das Piperidinderivat Doriden® besitzt als substituiertes Glutarsäureimid eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit den Barbituraten. Dieses Beispiel deutet an, wie die komplexen Stoffwechselvorgänge im Organismus immer wieder neue Möglichkeiten der Metabolisierung von Fremdstoffen offenbaren.

Nach unseren Versuchen in vitro, die als Grundvoraussetzung notwendig sind, könnte man bei einer Prüfung der verwendeten Substanzen am lebenden Organismus zu einer ganz anderen Schlußfolgerung gelangen. Schon durch verschiedene Versuchsanordnungen in vitro (Hämolysat-, Vollblut-, Erythrozytensuspensionsansätze) werden, wie wir sahen, andere Bedingungen geschaffen. So bildete Hydroxylamin (Konzentration 10^{-4} M) in Vollblutansätzen kein, im Hämolysat jedoch sofort und ausgiebig Methämoglobin. Die Faktoren, die dieses unterschiedliche Ergebnis bewirkten, können sowohl im Serum, als Schutzmechanismen, oder in der Erythrozytenmembran (Freisetzung verschiedener Enzyme bei der Hämolyse) verankert sein.

Bei der Prüfung von fraglichen Hb(III)-Bildnern sollte man also immer zunächst die Konfiguration der einzelnen Substanzen ins Auge fassen und auf Atome beziehungsweise auf Atomgruppen achten, die möglicherweise als Elektronendonatoren oder -rezeptoren in Frage kommen, und Redoxsysteme, eventuell Kreisprozesse (s. Kap. 4.12.3.) zu bilden vermögen - Hydroxylamin- und Nitrosogruppen; paraständige Hydroxylgruppen und para-Stellung einer Aminozu einer Hydroxylgruppe - wie dies bei den aromatischen Aminen, den aromatischen Nitroverbindung und den chinoiden Substanzen ausführlich beschrieben wurde. Weiterhin sollte man alle möglichen Metabolisierungsreaktionen, vor allem Reduktion und Oxydation am Stickstoff, die in ihrem Ausmaß bei den verschiedenen Individuen auch variieren können, in Betracht ziehen. Eine in dieser Beziehung bedeutende Rolle, die noch der weiteren Forschung anheim gestellt werden muß, spielt wohl die Entstehung von N-Oxyden bei den oxydativen Dealkylierungsprozessen in der Leber. Auch FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ 1966 ziehen die N-Oxydation von Nicotinsäureamid in Erwägung.

Mindestens genau so wichtig wie die Suche nach der auslösenden Ursache einer Methämoglobinämie ist die genaue Feststellung der Konzentration des oxydierten roten Blutfarbstoffs. In der gerichtsmedizinischen Praxis könnte zur grob-qualitativen Beurteilung einer Blutprobe bei einer fraglichen Methämoglobinämie zunächst ein Spektralbild des auf einen pH von 6,8 eingestellten Hämolysats aufgezeichnet werden. Zeigt sich bei 630 nm eine deutliche Absorption, so ist eine quantitative Bestimmung durchzuführen. Es ist eine ganze Reihe von Hb(III)-Nachweismethoden bekannt, die alle auf der charakteristischen Absorption des Hb(III) und deren Differenz gegenüber anderen Hb-Derivaten wie HbCO und Hb(III)CN basieren. Wir befaßten uns mit den gebräuchlichsten Verfahren: der Kohlenmonoxydmethode nach Kiese und der Cyanidmethode. Leider gelang es nicht, die bei der Kiese-Methode erzielten hohen Leerwerte auszuschalten. Die große Anzahl von Fehlermöglichkeiten macht es uns

verständlich, daß sich viele Laboratorien scheuen, die Hb(III)-Bestimmung selbst durchzuführen. Das Hämiglobinmolekül ist so empfindlich, daß es auf die geringste Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration mit einer Änderung seiner Lichtabsorption reagiert. Diese Eigenschaft des Hb(III) erfordert eine strenge Einhaltung des gewünschten pH von 6,8. Veränderte Lichtdurchlässigkeit der Erythrozytenstromata durch Cyanidzugabe beeinträchtigen die Genauigkeit der Messung. Durch ausreichende Pufferung und Zentrifugieren des Hämolysats kann diese Fehlermöglichkeit eliminiert werden. Von immenser Bedeutung für eine präzise Methodik ist die Hämolyse des Nativblutes in CO-gesättigtem Wasser zur Verhinderung der Spontanoxydation, die Verwendung von ionenfreiem, reinem destilliertem Wasser und die Benutzung von peinlich sauberen Gefäßen. Außerdem ist darauf zu achten, daß die Versuche nicht bei sehr hellem Licht durchgeführt werden. Der Einfluß von Sonnenlicht beziehungsweise von UV-Strahlen bewirkt eine Extinktionsänderung der Blutfarbstofflösung durch eine pH-Verschiebung ins Alkalische. Wird Dithionit verwendet, so ist die Küvette nur mit wenigen Körnchen dieser Substanz zu beschicken, um ein Ausfallen von kolloidalem Schwefel zu vermeiden. Man sollte auch eine mögliche Zersetzung dieser Verbindung berücksichtigen, wodurch in der Meßlösung eine pH-Verschiebung ins saure Milieu hervorgerufen wird.

Bei der Durchführung der Cyanidmethode sollte eine strenge Trennung der Meß- und Vergleichsküvette eingehalten werden, da das Cyanid ja nur in die Vergleichsküvette gegeben wird, und schon Spuren, die in die Meßküvette gelangen, das Extinktionsergebnis beeinflussen können. Nach unseren Erfahrungen beschriftet man am besten die beiden Küvetten sowie das Filterpapier, auf dem sie abgestellt werden, um Verwechslungen zu vermeiden. Zusätzlich sollten die beiden Küvetten immer nur von der gleichen Hand bedient werden.

Haben wir nun die Fehler im methodischen Vorgehen weitgehend ausgeschaltet, so müssen wir unsere Aufmerksamkeit dem Untersuchungsmaterial zuwenden. Ideal ist es natürlich, eine Blutprobe sofort nach der Entnahme zu messen. Dies wird jedoch in den seltensten Fällen möglich sein. Vor allem für gerichtsmedizinische Belange erscheint es also unbedingt notwendig, konservierende Maßnahmen zu treffen, um einen Fall fraglicher Hb(III)-Intoxikation nachzuweisen. Zunächst müssen die komplizierten reduktiven und oxydativen Prozesse in einer entnommenen Blutprobe berücksichtigt werden. Die Entscheidung, ob nun das gewonnene Blut zur Verhinderung der Reduktion verdünnt oder zu weitgehender Vermeidung der Spontanoxydation mit CO gesättigt werden soll, ist unseres Erachtens von der Höhe der geschätzten Hb(III)-

Konzentration in dieser Blutprobe abhängig zu machen. Wir dürfen also vorschlagen, bei Verdacht auf hohe Hb(III)-Konzentration das entnommene Blut zu verdünnen und bei vermutlich niedrigem Hb(III)-Gehalt die Blutprobe mit Kohlenmonoxyd zu sättigen. Am besten ist es wohl, beide Konservierungsmaßnahmen gleichzeitig anzuwenden. Das Untersuchungsmaterial sollte nach Möglichkeit bei niedriger Temperatur von ca. 2 - 5° C bis zur Messung aufbewahrt werden. All diese Maßnahmen können aber auch noch durch die eventuelle Anwesenheit einer Hb(III)-bildenden Substanz zusätzlich beeinflußt werden.

Zu dem zeitlichen Intervall zwischen Blutentnahme und Hb(III)-Bestimmung kommt bei uns in der gerichtlichen Medizin noch die verhältnismäßig schwierige Gewinnung von Frischblut. Abgesehen davon, daß sich der Grad einer Methämoglobinämie im lebenden und toten Organismus in kurzer Zeit verändern kann, spielen in der Leiche auch noch die Fäulnisprozesse eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Reduzierende und oxydierende Vorgänge werden in deutlicher Abhängigkeit von der Temperatur die Zustandsform des Hämoglobinmoleküls weitgehend bestimmen. Der bei der Fäulnis entstehende Schwefelwasserstoff vermag sich mit Hb(III) zu Hb(III)-Sulfid zu verbinden, das durch seine rote Farbe den Nachweis von Methämoglobin empfindlich stört.

Wenn man all das bedenkt, was sich an Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten herausgestellt hat, muß man bei der Ausführung und Deutung einer Hb(III)-Bestimmung größte Vorsicht anraten.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer Charakterisierung der Struktur, Eigenschaften, Anomalien und Derivate des Hämoglobinmoleküls wurden die Reduktionsvorgänge im intakten Erythrozyten beleuchtet. Methämoglobin, der oxydierte rote Blutfarbstoff, wurde eingehend beschrieben und seine Bildung durch die aus der Literatur bekannten anorganischen und organischen Agentien erläutert. Dabei wurde insbesondere die Methämoglobinbildung durch Stoffwechselprodukte von Arzneimitteln beachtet. Bei der Beschreibung der Nachweismethoden für Methämoglobin wurde auch auf eine mögliche Differenz zwischen dem klinischen Erscheinungsbild der Cyanose und dem tatsächlichen Methämoglobingehalt im Blut hingewiesen. Die Fehlermöglichkeiten bei der Hb(III)-Bestimmung durch Reduktion und Spontanoxydation des Hämoglobins in einer Blutprobe und in der Leiche sowie durch unachtsames methodisches Vorgehen wurden erläutert.

In eigenen Versuchen erfolgte der Hb(III)-Nachweis mit der grünen Kohlenmonoxydmethode nach KIESE und derCyanidmethode (550 nm). Für die Hb(III)-Bestimmung nach der Cyanidmethode wurde eine Eichkurve für das Beckmann-DK-2A-Spektrophotometer angefertigt. Bei der Inkubation verschiedener Arzneimittelmetaboliten in einer Erythrozytensuspension ergab sich Methämoglobinbildung durch p-Aminophenol und Na-Gentisinat.

ERLÄUTERUNG DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

DNS = Desoxyribonucleinsäure

GSH = Glutathion

GSSG = Glutathiondisulfid

Hb = Hämoglobin - allgemeiner Begriff, ohne Beachtung der Oxydationsstufe

Hb(II) = zweiwertiges Hämoglobin

Hb(III) = dreiwertiges Hämoglobin = Methämoglobin = Hämiglobin

HbCO = Kohlenoxydhämoglobin

Hb(III)CN = Cyanmethämoglobin

HbF = fetales Hämoglobin

Hb(III)F = Fluormethämoglobin

HbNB = Nitrosobenzolhämoglobin

HbNO = Stickoxydhämoglobin

$Hb(III)NO_2$ = Nitritmethämoglobin

HbO_2 = Oxyhämoglobin

NADH = reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid

LITERATURVERZEICHNIS

ALLEN, D.W.: in The Red Blood Cell, Ch. Bishop and D.M. Surgenor, Eds., P. 309 (Academic Press, London, 1964)

ALLEN, D.W. and J.H. JANDL: J. clin. invest. 40, 454 (1961)

ARGENTON, H.: in Erkrankungen durch Arzneimittel, H. Heintz, Ed., S. 188 (Thieme, Stuttgart 1966)

AUSTIN, J.H. and D.L. DRABKIN: J. biol. Chem. 112, 67 (1935)

BAADER, G.W.: Klin. d. Gegenw. 4, 124 (1957)

BETKE, K.: Der menschliche rote Blutfarbstoff bei Fetus und reifem Organismus (Springer, Berlin, 1954).

BETKE, K., J. GREINACHER u. F. HECKER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 229, 207 (1956 a)

BETKE, K., J. GREINACHER und v. FIETZE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 229, 220 (1956 b)

BETKE, K., H. STEIM u. O. TÖNZ: Dtsch. med. Wschr. 87, 65 (1962)

BREDOW, M. u. F. JUNG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 200, 335 (1942/43)

BÜCH, O.: Arch. Toxicol. 14, 53 (1952-54)

DANNENBERG, H. u. M. KIESE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 102 (1950 a)

DANNENBERG, H. u. M. KIESE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 410 (1950 b)

ENDERS, A. u. G. GRUPP: Arzneim.-Forsch. 1, 79 (1951)

EVELYN, K.A. and H.T. MALLOY: J. biol. Chem. 126, 655 (1938)

FILIPPINI, L.: Schweiz. med. Wschr. 95, 1618 (1965)

FLASCHENTRÄGER, B. u. E. LEHNARTZ, Eds.: Physiologische Chemie, Bd. 1, Bd. II b, Bd. II 2 d (Springer, Berlin, 1951, 1957, 1966)

FRIEDERICI, L.: Fol. haemat. 73, 49 (1956)

FRIEDERISCICK, F.K. u. W. TOUSSAINT: Med. Klin. 55, 459 (1960)

GASSER, C.: Helvet. paediatr. acta 9, 285 (1954)

GROSS, E., M. BOCK u. F. HELLRUNG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 200, 271 (1942/43)

HAAS, E.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 130 (1947)

HAUROWITZ, F.: J. biol. Chem. 193, 443 (1951)

HAUSCHILD, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie (Thieme, Leipzig, 1961)

HAVEMANN, R., F. JUNG u. B. v. ISSEKUTZ: Biochem. Zschr. 301, 116 (1939)

HENNEMANN, H.H.: Fortschr. d. Med. 82. Jg., Nr. 23, 889 (1964)

HEUBNER, W.: Ergebn. Physiol. 43, 9 (1940)

HEUBNER, W.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 205, 310 (1948)

HEUBNER, W.: Arch. Toxicol. 14, 51 (1952-54)

HEUBNER, W. u. M. STUHLMANN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 199, 1 (1942)

HEUBNER, W., M. KIESE, M. STUHLMANN u. W. SCHWARTZKOPF-JUNG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 313 (1947)

HOLZER, H. u. M. KIESE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 238, 117 (1961)

HOPPE-SEYLER, F.: Virchows Arch. 29, 233 (1864)

HÖRLEIN, H. u. G. WEBER: Dtsch. med. Wschr. 476 (1948)

HORECKER, B.L. and F.S. BRACKETT: J. biol. Chem. 152, 669 (1944)

JAFFEE, E.R.: in The Red Blood Cell, Ch. Bishop and D.M. Surgenor, Eds., P. 397 (Academic Press, London, 1964)

JUNG, F.: Biochem. Zschr. 305, 248 (1940)

JUNG, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 133 (1947 a)

JUNG, F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 157 (1947 b)

JUNG, F. u. H. REMMER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 206, 459 (1949)

JUNG, F. u. P. WITT: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 426 (1947)

KIESE, M.: Klin. Wschr. 565 (1942)

KIESE, M.: Biochem. Zschr. 316, 264 (1944)

KIESE, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 204, 190 (1947 a)

KIESE, M.: Klin. Wschr. 453 (1947 b)

KIESE, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 205, 747 (1948)

KIESE, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 206, 361 (1949 a)

KIESE, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 207, 99 (1949 b)

KIESE, M.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 207, 446 (1949 c)

KIESE, M.: Dtsch. Z. f. gerichtl. Med. 42, 429 (1954)

KIESE, M.: Pharm. Review 18, 1091 (1966)

KIESE, M. u. G. KLINGMÜLLER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 207, 655 (1949)

KIESE, M. u. W. MÜNCH: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 115 (1950)

KIESE, M. u. K.H. PLATTING: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 233, 484 (1958)

KIESE, M. u. D. REINWEIN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 392 (1950)

KIESE, M. u. I. REINWEIN: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 402 (1950)

KIESE, M. u. L. SEIPELT: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 200, 648 (1942/43)

KIESE, M. u. M. SOETBEER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 207, 426 (1949 a)

KIESE, M. u. M. SOETBEER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 207, 437 (1949 b)

KIESE, M. u. M. SOETBEER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 210, 305 (1950)

KIESE, M. u. H.D. WALLER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 345 (1950)

KIESE, M., D. REINWEIN u. H.D. WALLER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 210, 393 (1950)

KLECKER, E.: Therapie d. Gegenw. 88, 307 (1949)

KÜNZER, W.: Fol. haemat. 73, 405 (1956)

KUNZ, G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 199, 508 (1942)

KURZ, H. u. H.D. WALLER: Arch. Toxicol. 15, 291 (1954/55)

LACHHEIM, L., W. THAL u. O. HARNACK: Dtsch. Ges. Wes. 47/48, 2291 (1960)

LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie (De Gruyter, Berlin, 1963)

LEWIN, L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 25, 306 (1889)

LIPSCHITZ, W.L.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 205, 305 (1948)

MARKS, P.A.: in The Red Blood Cell, Ch. Bishop and D.M. Surgenor, Eds., P. 211 (Academic Press, London, 1964)

MARTI, R.: Normale und anomale Hämoglobine (Springer, Berlin, 1963)

MATTHIES, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 229, 331 (1956)

MOESCHLIN, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen (Thieme, Stuttgart, 1956)

MOESCHLIN, S.: Schweiz. med. Wschr. 87, 123 (1957)

MOSER, P. und P. KRAUSE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 211, 468 (1950)

NISSLER, K. u. W. THAL: Med. Klin. 40, 1640 (1963)

PERUTZ, M.F. and O. WEISZ: Nature 160, 786 (1947)

PULINA, B.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 200, 324 (1942/43)

REMMER, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 229, 450 (1956)

SIMON, C.: Arch. Franc. Ped. 23, 231 (1966)

VAN SKLYKE, D.D., A. HILLER and I.R. WEISINGER: J. biol. Chem. 166, 121 (1946)

SCHWERD, W.: Dtsch. Zschr. f. gerichtl. Med. 52, 7 (1961)

SCHWERD, W.: Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate (Schmidt-Römhild, Lübeck, 1962)

SCHWERD, W. u. H. KECK: Dtsch. Zschr. f. gericht. Med. 50, 437 (1960)

THAL, W., L. LACHHEIM u. M. MARTINEK: Arch. Toxicol. 19, 25 (1961)

THAUER, R.K., A. MEIFORTH u. H. UEHLEKE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 252, 291 (1965 a)

THAUER, R.K., G. STÖFFLER u. H. UEHLEKE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 286 (1965 b)

THAUER, R.K., G. STÖFFLER u. H. UEHLEKE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 252, 32 (1965 c)

UEHLEKE, H.: in Fortschritte der Arzneimittelforschung, E. Jucker, Ed. Vol. 8, 195 (Birkhäuser, Basel, 1964 a)

UEHLEKE, H.: in Krebsforschung und Krebsbekämpfung, Bd. 5 (Urban u. Schwarzenberg, München, 1964 b)

UEHLEKE, H.: 4. Internat. Kongr. internat. Föd. Hyg. Präv. Med. P. 291 (Wien, Mai 1965)

UEHLEKE, H., A. BURGER u. J. WAGNER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 254, 152 (1966)

WAGNER, J. u. A. BURGER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 254, 138 (1966)

WAGNER, J. u. H. UEHLEKE: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 254, 381 (1966)

WERNER, U., W. THAL u. W.D. WUTTKE: Dtsch. med. Wschr. 80, 1632 (1955)

WILHELMI, H.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 200, 305 (1942/43)

WILLIAMS, R.T.: Detoxication Mechanisms (Chapman and Hall, London, 1959)

WOLF, H. u. G. DÖRING: Arch. Kinderh. 163, 167 (1960)

ZIPF, H.F.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 206, 225 (1949)

Herrn Professor Dr. Gg. Schmidt danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes, sowie für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. H.-D. Waller danke ich für die wertvollen Anregungen zur Herstellung der Eichkurve.

Lebenslauf

Am 13. August 1943 wurde ich, Gerda Frey, als Tochter des jetzigen Landgerichtspräsidenten Dr. Bert Frey und seiner Frau Cäcilie, geb. Schultheiß, in Tübingen geboren. Dort besuchte ich auch die Volksschule und das Gymnasium.

Am 22. Februar 1962 legte ich am Wildermuthgymnasium die Reifeprüfung ab und begann im Sommersemester 1962 das Studium der Medizin in Tübingen, wo ich am 9. April 1963 das Vorphysikum und am 9. Oktober 1964 das Physikum bestand. Die beiden ersten klinischen Semester verbrachte ich in Wien. Im Wintersemester 1965/66 setzte ich mein Studium in Hamburg fort, wo ich am 28. August 1968 das Medizinische Staatsexamen bestand.